

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA**

**Evaluación de la resistencia al virus de PLRV  
mediante el mecanismo de ARN de Interferencia  
(ARNi) en líneas transgénicas**

**TESIS**

**Para optar al Título profesional de Bióloga con mención en Biología  
Celular y Genética**

**AUTOR**

**Jeanette Paola Orbegoza Ramírez**

**Lima-Perú**

**2012**

***A mi abuela Dora Georgina, nunca te olvidaremos.***

## DEDICATORIA

Al Centro Internacional de la Papa (CIP). Al PhD. Jan Kreuze y al Dr Marc Ghislain, por haberme dado la oportunidad de desarrollar la tesis y asesorarme en todo momento. Asimismo, al Dr. Pablo Ramírez, por su amistad y apoyo en los inicios de mi formación profesional, así como las correcciones y sugerencias en la realización del presente trabajo de investigación.

Al Fondo de Promoción de Trabajo de Tesis de Pregrado auspiciado por el Vicerrectorado de Investigación–Consejo Superior de Investigaciones y la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por el apoyo brindado.

A la M.Sc Liliam Gutarra y a la PhD. Sylvie Priou, por haberme dado la oportunidad de iniciarme en el CIP. A la Blga. Giovanna Muller y el Blgo Jorge Tenorio por el apoyo y consejos brindados, así como a los Sres. técnicos del laboratorio del CIP, José Rodríguez, Luis Gutiérrez, Martín Requejo, Hugo Espinoza, Marcos Meza, la Sra. Catita y Evita, por su amabilidad, apoyo técnico y atención en todo momento.

Al equipo del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del CIP, y a mis amigos Karin, Adita, María Lupe, Marielena y Percy, por su amistad, ocurrencias y conversaciones, muchas gracias chicos por todo.

Agradezco a mi familia, mis abuelos Hermes y Francisca e infinitamente a mis padres Betty y Luis José, así como mi hermano Rubén, por creer en mí, respetar mis decisiones, por su esfuerzo y empeño en que me desarrolle profesionalmente y estar siempre e incondicionalmente a mi lado.

De manera muy especial a Pedro Palermo por formar parte de mi vida y dejarme ser parte de la suya, gracias por todos los momentos que hemos compartido y por los que vendrán.

A todas las personas que de una u otra manera han contribuido en la realización de esta tesis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
ADN-T	Acido desoxiribonucleico transferible
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNdc	ARN aberrante de doble cadena
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
ARNsi	ARN pequeños de interferencia
ATP	Adenina trifosfato
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BNYV	<i>Beet- necrotic-yellow-vein</i>
BSA	Albúmina Sérica Bovina
BYDV	<i>Barley Yellow Dwarf Virus</i>
CTP	Citocina trifosfato
°C	Grados centígrados
CIP	Centro Internacional de la Papa
cm	Centímetros
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
Da	Dalton
DAS-ELISA	<i>Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxi ribonucleósidos tri-fosfato
dpi	días post infección
DO	Densidad óptica
DR	Densidad Relativa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et. al.</i>	y colaboradores
GTP	Guanina trifosfato
g	Gramos
GUS	<i>Beta Glucuronidase protein</i>
h	Horas

HCl	Acido clorhídrico
hpARN	<i>hairpin</i> ARN
IgG-PLRV	Inmunoglobulina G para PLRV
IgG-AP	fosfatasa alcalina-IgG)
K	Kilo
Kb	Kilobase
Kcal	Kilo calorías
KCl	Cloruro de Potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato diácido de potasio
Km	Kanamicina
L	Litro
LB	<i>Luria broth</i>
LiCl	Cloruro de Litio
M	Molar
mA	miliamperios
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
mg	Miligramo
min	minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato disódico
nm	nanómetros
NaOH	Hidróxido de sodio
<i>nptII</i>	Neomicina fosfotransferasa II
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pH	Potencial de hidrógeno
pb	pares de bases
PBS	Fosfato Suferado Salino
PBS-T	Fosfato Suferado Salino y Tween-20
PC	Proteína de cubierta
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLRV	Virus del enrollamiento de la papa
PC-PLRV	Proteína de cubierta de PLRV

pg	picogramo
PVP	Polivinilpirrolidona
PVX	<i>Potato virus X</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
RB	Borde derecho
RdRp	<i>RNA dependent RNA polymerase</i>
RDP	Resistencia Derivada del Patógeno
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
rpm	Revoluciones por minuto
SAS	<i>Systemic Acquired Silencing</i>
SbDV	<i>Soybean Dwarf Virus</i>
SDS	Sodio dodecil sulfato
seg	segundos
SGPT	Silenciamiento genético postranscricional
siRNA	<i>RNA small interfering</i>
SSC	Citrato salino estándar
TBE	Tris/Borato/EDTA
TEMED	Tetrametil etileno diamino
Tris	Tris hidroximetil aminometano
U	Unidades
UTP	Uridina trifosfato
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VPg	<i>Viral protein genome linked</i>
W	Watts
28S rARN	ARN ribosomal de la subunidad 28S
<sup>32</sup> P	Fósforo 32
%	porcentaje
μl	microlitro
mCi	milicurie

## ÍNDICE

**DEDICATORIA**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**ÍNDICE**

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
	II.1 Generalidades de la papa	5
	II.2 Variedad Desiree	6
	II.3 Virus del enrollamiento de la papa (PLRV)	7
	II.4 Características de la partícula viral	8
	II.5 Variabilidad del PLRV	10
	II.6 Transmisión	11
	II.7 Rango de hospedantes	13
	II.8 Sintomatología	13
	II.9 Resistencia a virus por mecanismo derivado del patógeno (RDP)	14
	II.9.1 Proteína de la cubierta (PC)	16
	II.9.2 Resistencia viral mediante el mecanismo de ARN de interferencia (ARNi)	18
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
	III.1 Material biológico	23
	III.2 Métodos	23
	III.2.1 Extracción de ADN	23

III.2.2 <i>Southern Blot</i>	25
III.2.2.1 Digestión y electroforesis de las muestras	25
III.2.2.2 Transferencia de <i>Southern Blot</i>	26
III.2.2.3 Preparación y cuantificación de la sonda	27
III.2.2.4 Marcaje de la sonda	28
III.2.2.5 Hibridación	29
III.2.2.6 Detección	29
III.3 Introducción y propagación de las plantas transgénicas de papa a invernadero	30
III.4 Obtención de fuente de inóculo	31
III.5 Infección con injertos	32
III.6 Evaluación de síntomas	33
III.7 Prueba serológica	33
III.7.1 DAS-ELISA	33
III.7.1.1 Sensibilización de placas	34
III.7.1.2 Adición de las muestras	34
III.7.1.3 Adición del conjugado (fosfatasa alcalina-IgG)	34
III.7.1.4 Adición del sustrato enzimático	36
III.8 Extracción de ARNs	36
III.9 Obtención del control positivo por agroinfiltración	38
III.10 <i>Northern Blot</i>	39
III.10.1 Corrida electroforética en gel de poliacrilamida	39
III.10.2 Preparación y marcaje de la sonda	41



III.10.3 Pre-hibridación e Hibridación	43
III.10.4 Detección	43
III.10.5 Análisis de datos	44
IV. <b>RESULTADOS</b>	45
IV.1 Caracterización molecular de plantas transformadas	45
IV.1.1 Hibridación por <i>Southern blot</i>	45
IV.2 Evaluación de la resistencia al virus PLRV	47
IV.2. 1 Infección primaria	47
IV.2. 2 Infección secundaria	50
IV.2. 3 Infección terciaria	53
IV.3 Evaluación del mecanismo de ARNi por <i>Northern blot</i>	55
V. <b>DISCUSIÓN</b>	59
V.1 Análisis por <i>Southern Blot</i> de la incorporación del transgén	59
V.2 Respuesta de resistencia a PLRV por ARN	60
VI. <b>CONCLUSIONES</b>	68
VII. <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	69
VIII. <b>ANEXO</b>	82

## RESUMEN

El virus del enrollamiento de la papa (PLRV) es responsable de pérdidas severas en el rendimiento y calidad del cultivo de la papa en todo el mundo. Existen papas nativas y especies silvestres que presentan altos niveles de resistencia a PLRV (*Solanum brevidens*, *S. tuberosum*, *S. chacoencse* y *S. raphanifolium*). El desarrollo de nuevas variedades utilizando estas fuentes de resistencia es uno de los retos actuales del mejoramiento genético, sin embargo la naturaleza genética del cultivo de la papa que se desea mejorar es en la mayoría de los casos incompatible entre cultivos, sumándose a ello que la obtención de estos cultivos mejorados es cerca de 20 años. Por lo tanto la inserción directa de un gen que confiere resistencia a una variedad de importancia comercial tiene una ventaja muy significativa. En la presente tesis se evaluaron diez eventos (variedad Desiree) transformados con un constructo tipo *hairpin* que contenía el sistema de ARN de interferencia (ARNi), el cual mantiene activo y constante la formación del ARNdc entre las secuencias homólogas del transgen y el virus de PLRV. Los eventos fueron caracterizados por PCR y *Southern blot*, evidenciándose que tenían en su genoma entre una a dos copias del transgen. Los ensayos serológicos de DAS-ELISA seleccionaron cuatro eventos con alta resistencia (bajas o nulas concentraciones del virus PLRV) durante su infección primaria, secundaria y terciaria. Finalmente, se determinó por Northern Blot que la resistencia a PLRV está relacionada con la presencia de los fragmentos pequeños de ARN (ARNsi) formados a partir del mecanismo de ARNi.

**PALABRAS CLAVE:** Papa, transformación, PLRV, ARNi, ARNsi.

## ABSTRACT

Potato Leafroll Virus (PLRV) is responsible for severe losses in yield and quality of potato worldwide. There are native and wild potatoes with high levels of resistance to PLRV (*Solanum brevidens*, *S. etuberosum*, and *S. chacoense raphanifolium*). The development of new varieties using these sources of resistance is one of the current challenges of genetic improvement crop, however the genetic nature of the potato in most cases is incompatible between varieties, moreover to obtain the desired resistance takes over 20 years. Therefore the direct insertion of a gene that confers resistance to a variety of commercial importance have a significant advantage. The present thesis evaluated ten events (Desiree variety) transformed with a hairpin-type construct, containing the RNA interference system (RNAi), it will keep active and constant the formation of dsRNA between the homology sequence of transgene and PLRV. The events were characterized by PCR and *Southern blot*; they had in their genome from one to two copies of the transgene. Serological tests of DAS-ELISA selected four events with high resistance (low or zero concentrations of PLRV) during primary, secondary and tertiary infection. Finally, it was determined by *Northern Blot* that the resistance to PLRV is related to the presence of fragments of small interference RNA (siRNA) formed from the mechanism of RNAi.

**KEY WORDS:** Potato, transformation, PLRV, RNAi, siRNA.

## I. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) originaria del Perú, es uno de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial ocupando el cuarto lugar de producción después del maíz, trigo y arroz (Scott *et al.*, 2000). Al igual que otros cultivares, también es vulnerable al ataque de un gran número de plagas y enfermedades causadas por diversos patógenos como hongos, nemátodos e insectos, siendo los virus los principales causantes de grandes pérdidas económicas. En el caso de la papa, el virus del enrollamiento de la papa o PLRV es el más perjudicial. La baja productividad causada por esta enfermedad no sólo reduce la producción y calidad del cultivo, además incrementa años tras año el costo directo de las medidas de control contra esta enfermedad y que se aplican de forma rutinaria en el rendimiento comercial de este cultivo (Batool *et al.*, 2011).

En este sentido se han venido desarrollando e implementando nuevas alternativas contra la diseminación e infección viral, como los programas de producción de tubérculos libres de virus, y adecuadas prácticas agronómicas que incluyen esquemas de certificación, inspecciones y métodos de diagnóstico de cultivo de papa; sin embargo éstas no siempre aseguran la ausencia o presencia del virus, siendo su aplicación limitada en muchos países en desarrollo por razones económicas y ambientales (Umar *et al.*, 2011).

De otro lado, se tiene al mejoramiento genético convencional como una herramienta de amplio uso que consiste en el cruce entre una especie silvestre que presente resistencia contra la propagación de la infección del virus y una susceptible, decreciendo las pérdidas causadas por la enfermedad. Sin embargo, la búsqueda de una resistencia frente al PLRV no es tan fácil como para otros virus de la papa, tales como PVY o PVX. A esto debemos sumar que los genes de interés se encuentren identificados en plantas silvestres para el entrecruzamiento con cultivares susceptibles, siendo una

limitante la escasa información de estos genes en el genoma completo de la papa. Además el mayor obstáculo en la obtención de estas variedades mejoradas es la carencia de genes mayores (genes R) de resistencia vertical o que confieran inmunidad al virus (Swiezynski, 1994).

Asimismo este método resulta ser muy dificultoso, considerando que la resistencia a la infección por PLRV es cualitativa, de naturaleza poligénica, y con baja heredabilidad, además los patrones de herencia de los caracteres en papa son complejos, debido a que es un cultivo heterocigoto tetraploide (Davidson, 1973; Swiezynski, 1994; Thomas *et al.*, 1997; Cordero, 2008; Nikan y Barker, 2008).

A su vez la obtención de plantas resistentes mediante el mejoramiento convencional no es fácil de ejecutar y se invierte mucho tiempo, considerando que los caracteres indeseados puedan estar ligados con los genes de interés y ser heredados (Davidson, 1973). Por estas razones son pocas los cultivos de papa con una considerable resistencia al PLRV, y hasta la fecha ningún cultivar ha sido considerado como inmune a esta enfermedad (Solomon, *et al.*, 2001; Nikan y Barker, 2008; Arif *et al.*, 2011).

Ante estas diversas limitantes se buscan nuevas estrategias que permitan obtener una resistencia duradera y confiable contra este virus, encontrando en la introducción de genes o mecanismos de resistencia por ingeniería genética una buena alternativa (Barker *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2000; Ehrenfeld *et al.*, 2004).

Entre estos mecanismos de resistencia esta el ARNi que consiste en la introducción de un transgen que contenga una secuencia derivada del genoma viral en orientación sentido unida por un intrón a la misma secuencia pero en orientación antisentido, esta estructura durante la transcripción formará un ARN aberrante de doble cadena el cual producirá los ARNsi otorgando la resistencia frente el ataque viral.

Diversos reportes del uso de este mecanismo en múltiples virus se han obtenido con éxito (Sonoda y Nishiguchi, 2000; Tougou *et al.*, 2006).

Por estas razones el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la eficacia del mecanismo de resistencia desencadenado por el ARNi en la regulación del PLRV, lo cual es muy importante para los programas de mejoramiento genético destinados a generar resistencia contra esta devastadora enfermedad, y así aplicarlos a otros complejos virales, demostrando que esta herramienta biotecnológica es conservada y útil para este cultivo así como otros cultivos de interés agrícola y comercial.

## **I.1 OBJETIVOS**

### **I.1.1 Objetivo General**

Evaluar la resistencia al virus PLRV en líneas transgénicas que contengan el mecanismo de ARNi.

### **I.1.2 Objetivos Específicos**

1. Determinar el número de copias del transgen en el genoma de las plantas transformadas.
2. Evaluar los niveles de resistencia a PLRV de los eventos transformados.
3. Demostrar la producción de ARNsi por el mecanismo de ARNi.

## **I.2 HIPÓTESIS**

Las plantas transgénicas que presenten el sistema de ARN de interferencia activo y con una alta producción de ARNsi, exhibirán la resistencia a PLRV.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Generalidades de la papa

Se ha establecido que el Perú es el centro de origen y domesticación de la papa cultivada la cual ha sido utilizada desde hace 10,000 años. (Ochoa, 1999; Estrada, 2000; Spooner y Hetterscheid, 2005). Este cultivo se desarrolló en los andes peruanos, al norte del lago Titicaca, Puno-Perú (Hawkes, 1990), y es considerado uno de los más importantes en el mundo ocupando el quinto lugar respecto al consumo humano y la cuarta posición en cuanto a su producción luego del trigo, arroz y maíz (Horton y Anderson, 1992). En la historia la papa ha tenido un papel importante salvaguardando cientos de vidas en épocas de hambruna y malnutrición; aumentando su consumo durante el siglo XIX a nivel mundial debido a su gran aporte en calorías y la gran cantidad de carbohidratos que posee, 22% del peso total del tubérculo, igualmente contribuyó a reducir el azote de enfermedades como el escorbuto y el sarampión, sumándose a esto su participación durante la explosión demográfica en Europa, los Estados Unidos y el Imperio Británico (FAO,2008).

Actualmente está presente en la dieta de millones de personas a nivel mundial, aumentando su consumo año tras año, y en especial en los países en desarrollo (FAOSTAS, 2008). En todo el mundo existen alrededor de 5,000 variedades de papa de las cuales 4,000 pertenecen a Latinoamérica y 2,301 al Perú, convirtiéndolo en el país con mayor diversidad de variedades de papa a nivel mundial (MINAG, 2008), siendo las variedades nativas las más importantes por su atractivo comercial, culinario y por poseer genes de resistencia a diversos patógenos, entre ellas se tienen: *Solanum tuberosum* ssp. andígena, *S. phureja* , *S. stenotomun*, *S. chaucha* , *S. gonicalix* entre otras (Christensen, 1996).



En los últimos años en el Perú el cultivo de papa ha desplazado al maíz y arroz, y actualmente alrededor de 270 mil hectáreas anuales son sembradas con este cultivo, además 600 mil familias dependen económicamente de éste. Se estima que en promedio anualmente su producción es cerca de 3 millones de toneladas (INEI, 2004; CIP, 2007; Bernaola, 2008; MINAG, 2008; FAOSTAS, 2008).

La amplia adaptabilidad a los diferentes climas, excelente rendimiento, y su alto valor nutritivo hacen que este cultivo tenga una gran variabilidad. Se sabe que en promedio una sola papa proporciona 80 Kcal siendo el contenido de proteínas de 1.96 % del peso fresco superando al trigo, avena y verduras, así también presenta en su composición la vitamina C, el complejo B (tiamina, riboflavina, niacina), además de fibra dietética (Solorzano, 2006) y minerales como hierro y zinc (Burgos, 2006).

Al igual que otros cultivares, éste también es vulnerable al ataque de un gran número de plagas causadas por diversos patógenos, como hongos, virus, nemátodos e insectos; siendo los virus los mayores responsables de su degeneración. En el caso de papa el virus más perjudicial es el PLRV. Se estima que anualmente se pierde cerca de 20 millones de toneladas de papa a causa de esta enfermedad en todo el mundo (Solomon *et al.*, 2001). En el caso de sinergismo con otros virus como PVY o PVX se incrementan al 90% las pérdidas en la producción (Brandolini *et al.*, 1992).

## **II.2 Variedad Desiree**

Esta variedad fue obtenida en Holanda e introducida al Reino Unido en el año 1962. Tiene su origen del cruce entre las variedades Urgenta y Depesche (Hamester y Hils, 2003). Sus plantas presentan tallos numerosos, largos y robustos, los nudos y los entrenudos son de color rojo-púrpura; sus hojas son de tamaño pequeño y textura rígida.

Los foliolos primarios son pequeños y ovales sus nervios son bastante profundos; las flores son de color rojo-morado claro, su inflorescencia robusta y muy colorada. Es de maduración semitardía y de muy buen rendimiento. El follaje se desarrolla bastante rápido, cubriendo el terreno y es resistente a la sequía. Sus tubérculos son largos, ovalados, gruesos, ojos superficiales, con carne amarilla clara, de cáscara rosada y lisa. En cuanto a la calidad culinaria es bastante firme al cocer, de sabor neutro y apto para la preparación de papas fritas.

Se sabe que este cultivo es inmune a la sarna verrugosa, y tiene una alta resistencia a la podredumbre blanda causada por *Erwinia carotovara* (*The European cultivated potato database*, 2008), es susceptible a PLRV, al oomiceto *Phytophthora infestans*, así como a la bacteria *Ralstonia solanacearum* (RIVRO, 1989; Solorzano, 2006).

### **II.3 Virus del enrollamiento de la papa (PLRV)**

El virus del enrollamiento de la papa, conocido también como el virus de necrosis del floema de la papa (Salas, 2007), pertenece al género *Polerovirus*, familia: *Luteoviridae*. Este grupo también incluye a otros virus importantes como: *Beet mild yellowing virus* (BMVY), *Beet western yellow virus* (BWY), *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV), *Cucurbit aphid-borne yellow, virus* (CABYV), *Tobacco necrotic dwarf virus* (TNDV) (Talians'ky *et al.*, 2003).

Entre todos ellos el PLRV es considerado uno de los más importantes, debido a su amplio alcance de dispersión y devastación en cualquier lugar que se cultive la papa (Barker y Watherhouse, 1999) siendo más perjudicial en zonas con climas cálidos y con altas poblaciones de áfidos (Salas, 2007). La reducción de la producción de los tubérculos debido a la necrosis causada por esta enfermedad ha sido el motivo de diversos estudios en la sintomatología, el rango del hospedero, las razas que pueda tener, su forma de transmisión, los métodos de diagnóstico, tipo de resistencia y las

medidas que deben tomarse para su control a fin de contribuir a la disminución de su propagación en las plantaciones de papa (Cabrera, 2007).

Los primeros reportes acerca de esta enfermedad en el cultivo de la papa fueron a mediados del siglo XVIII donde las plantaciones a campo abierto conllevaron a una pérdida en el rendimiento, ocasionando una degeneración transmitida a los tubérculos. En 1747 se describió por primera vez a PLRV, y en 1751 fue asignado el término *curl* a los síntomas de deterioro en las cosechas ocasionados por este patógeno. En 1764 algunas zonas de Europa fueron afectadas por la infección, extendiéndose la enfermedad a todas las áreas principales de cultivo de la papa. En años posteriores se sugirió que esta degeneración era infecciosa y que las plantas enfermas debían destruirse para prevenir su diseminación. En 1911 otra epidemia tuvo lugar en el noreste de Colorado y al oeste de Nebraska, lo que evidenció la presencia de la enfermedad en América. Siendo en 1916 comprobada la naturaleza infecciosa de PLRV y para finales de 1967 se lograría purificar el virus iniciándose el estudio de esta enfermedad (Cordero, 2008).

#### **II.4 Características de la partícula viral**

El virus está formado por partículas isométricas entre 24-26 nm de diámetro, con perfil hexagonal, su genoma completo ha sido publicado hace más de una década atrás, describiéndolo como una hebra de ARN simple monopartita positiva, cuyo peso molecular es de  $20 \times 10^6$  Da y con una secuencia nucleotídica de 5,987 Kb (Talianky *et al.*, 2003).

Presenta en su extremo inicial 5' una unión covalente con una proteína VPg de 7.2 kDa, su extremo 3' no está poliadenilado (Sadowy *et al.*, 2001). Su genoma se encuentra organizado en 8 ORFs o también conocidos como marcos de lectura abierta, los cuales están divididos en dos *clusters* de genes. El primer *cluster* está en la zona media cerca al extremo 5' (ORFs 0-2), y comprende genes expresados por el ARN genómico, el segundo está ubicado cerca al extremo 3' (ORFs 3-7) siendo los genes expresados por la

traducción del ARNm subgenómico, su extremo 3' es coterminal con el ARN genómico. Estos dos *clusters* están separados por una pequeña región intergénica (197 pb) de función desconocida (Martin, 1990; Solorzano, 2006). Dentro de las funciones de estos fragmentos, se conoce que el ORF-O codifica una proteína de 28 kDa, siendo responsable del desarrollo de los síntomas del PLRV, el ORF-1 codifica una proteína de 70 kDa que actúa como una proteínasa, además su secuencia contiene la proteína de unión al genoma del virus (VPg) (Talianky *et al.*, 2003), y se cree que cumpla otras funciones como de helicasa. A su vez el ORF-2 está subdividido en ORF2a y sobrelapa al ORF-2b, ambos codifican proteínas cuyos pesos son 70 y 69 kDa respectivamente, es posible que cumplan la función de replicasa viral pues contienen la helicasa y el motivo GDD, que son característicos de la RdRp (Vazquez *et al.*, 2001).

Del segundo *cluster*, se transcriben dos ARN subgenómicos, el primero está constituido por los siguientes ORFs: el ORF-3 el cual es una secuencia altamente conservada ubicada en una región subgenómica del ARNm. Codifica la PC de 23 kDa, que es responsable de varias características del virus, como blanco antigénico en las pruebas serológicas, siendo relacionado con la especificidad de la transmisión del virus hacia la planta, protección cruzada y exclusión mutua (Kawchuk *et al.*, 1990).

El ORF-4 tiene una secuencia de 17 Kb que es sobrelapada por el gen de la PC, se cree que su función está relacionada con el movimiento del virus, y que la proteína que es codificada esté unida a la hebra simple de ARN del virus (Tacke *et al.*, 2001)

Por otro lado el ORF-5, codifica una proteína que actúa como un factor de transmisión del virus (Talianky *et al.*, 2003; Ashoub, 2003).

El segundo ARN subgenómico sirve como ARNm para el ORF-6 (7.1 kDa) y el ORF-7 (14 kDa) su función está asociada a la regulación transcripcional y de unión al ADN (Ashoub, 2003).

## II.5 Variabilidad del PLRV

En los primeros reportes se distinguió los distintos grados de síntomas de PLRV según su comportamiento en la planta hospedera *Physalis floridiana*, asignándole diferentes razas. Singh (1982) agrupó estas razas en tres categorías: tenue, moderada y severa (Cordero, 2008). Además se realizaron estudios a nivel de los epítopes de las partículas virales de estas razas encontrándose una variabilidad no tan significativa en la respuesta de las plantas de papa a la infección (Salas, 2007).

A pesar de la diversidad en las propiedades biológicas que presentan estas razas, los estudios moleculares de sus secuencias nucleotídicas han demostrado que existe una fuerte similitud entre las razas procedentes de diferentes partes del mundo. Como es el caso de Canadá que presenta la raza PLRV-C, en Escocia la raza PLRV-S, de Holanda la PLRV-N y Australia la raza PLRV-A, de las cuales las secuencias de PLRV-C, S y N, comparten el 98% de identidad, y la raza PLRV-A el 93% de identidad con otros aislados, éste último es el más divergente. Hasta la actualidad se siguen reportando nuevas razas de este virus como el aislado de Polonia, PLRV-P el cual está más relacionado con PLRV-C, S y N (Guyader y Ducray, 2002).

También se han encontrado casos parecidos con aislados de PLRV en Egipto, teniendo un grado de similaridad de 98% con el PLRV-S (Ashoub, 2003).

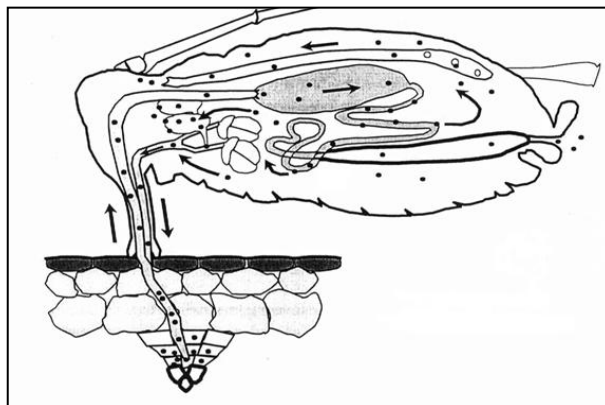
Por otro lado, en la India al comparar las secuencias de PC-PLRV con razas europeas y canadienses, se encontró una considerable homología tanto nucleotídica como a nivel de los aminoácidos, entre 97-98%, esto refuerza también el uso del gen de PC como una secuencia altamente conservada en el genoma del virus de PLRV (Mukherjee *et al.*, 2003). Los estudios concluyen que el PLRV no presenta un alto grado de variación en su secuencia nucleotídica a nivel mundial (Guyader y Ducray, 2002).

## II.6 Transmisión

El virus de PLRV se transmite de forma natural mediante tubérculos infectados (transmisión vegetativa) y áfidos (transmisión por vectores), siendo la transmisión por injertos un mecanismo artificial, efectivo y rápido que es usado para fines experimentales (Salas, 2007).

La transmisión de los virus mediante áfidos es de dos formas: no persistente y persistente, se sabe que todos los virus que infectan a la papa lo hacen de manera no persistente a excepción del PLRV que lo hace de forma persistente y circulativa restringida al floema (Cañedo, 1997), esto significa que el áfido al alimentarse del tejido del floema de una planta infectada también adquiere el virus; siendo su periodo de adquisición de 1.6 min, este es el tiempo que tiene el áfido para alimentarse del floema (Loebenstein, *et al.*, 2001). Posteriormente el virus circula desde el sistema digestivo, a través de las células epiteliales del intestino grueso hacia la hemolinfa, y finalmente atraviesa la membrana de las glándulas salivales hacia la saliva, comprendiendo su periodo de latencia de 24 a 48 h. Durante este periodo el áfido permanece normalmente no virulífero, luego el virus puede ser transmitido exitosamente (Fig. 1).

Se conoce que la interacción simbiote entre el virus y una bacteria perteneciente al género *Buchnera*, que se encuentra dentro del áfido, hace que el virus pueda protegerse de la degradación proteolítica y permitir su circulación dentro del áfido. Se cree que esta bacteria posee una proteína, llamada simbionina, que permitiría la estabilización y protección del virus de la degradación, además de determinar la naturaleza persistente del virus dentro de la hemolinfa del áfido logrando la estadía del mismo durante toda la vida del áfido (Gray y Gildow, 2003).



**Figura 1: Transmisión del virus PLRV**, por el áfido *Myzus persicae* (Sulzer), de forma persistente y circulativa restringida al floema (Gray y Gildow, 2003).

A la fecha se conoce cerca de 10 diferentes especies de áfidos que transmiten el PLRV, siendo los más representativos: *Myzus persicae* (Sulzer), *Myzus nicotianae* (Blackman), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), *Aphis gossypii* (Glover), *Aulacorthum solani* (Kaltenbach), *Aphis nasturtii*, *Myzus ascalonicus* y *Neomyzus circumflexus* (Büchen, 2002). El áfido de mayor predominio es el *Myzus persicae* (Sulzer) “pulgón verde del duraznero”, su infección es de tipo persistente y circulativa restringida al floema, de alta peligrosidad y de frecuente aparición a nivel mundial. Ocasiona daños tanto directos como indirectos que reducen la producción hasta un 90%. A su vez, es conocido por la facilidad de ser resistente frente a los insecticidas (Solomon *et al.*, 2001). Por otro lado se tiene evidencia que el PLRV se transmite mecánicamente, si los extractos de plantas han sido previamente infectados con áfidos portadores del PLRV e inoculados mecánicamente con el virus *Pea enation mosaic virus-2* (PEMV-2), género *Umbravirus* (Mayo *et al.*, 2000).

## II.7 Rango de hospederos

PLRV tiene un amplio rango de hospederos, siendo el más importante *Solanum* spp. (especies cultivadas y no cultivadas), así como las siguientes especies vegetales: *Lycopersicon esculentum*, *Solanum melongena*, *Atropa belladonna*, *Capsella bursa-pastoris*, *Datura stramonium*, *Solanum villosum*, *Physalis angulata*, *Physalis floridana*, *Nicandra physaloides*, *Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus caudatus*, *Celosia argentea*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana clevelandii*, *Nolana lanceolata*, *Montia perfoliata*, *Petunia hybrida*, *Datura aegyptica*, *Datura fastuosa*, *Datura chlorantha*, *Solanum dulcamara*, *Solanum nigrum*, *Solanum tuberosum* y *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* o *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* (Büchen, 2002; Cordero, 2008). Igualmente se sabe que infecta al Olluco (*Ullucus tuberosus* Loz) (Salas, 2007).

## II.8 Sintomatología

El desarrollo de los síntomas dependen del tipo de cultivo que infecte el PLRV, así como las condiciones de crecimiento en que se encuentre la planta, el estado vegetativo, nutricional, edad, y condiciones ambientales: temperatura, fotoperiodo, intensidad lumínica, humedad del suelo, etc. (Fribourg, 1995; Taliansky *et al.*, 2003; Salas, 2007).

Las plantas que son infectadas por PLRV, presentarán los síntomas primarios; en el caso de papa dentro de tres a cuatro semanas se puede observar que las hojas superiores apicales se tornan más rígidas y erectas con un ligero enrollamiento y frecuente clorosis internerval. En cambio en algunas variedades se evidencia un enrollamiento en la base de los folíolos, y en otras sus hojas jóvenes presentan una tonalidad púrpura a rojiza, además del enrollamiento de las hojas, lo cual se puede extender hacia las de mayor edad a medida que madura la planta (Salazar, 1995).



Los síntomas de las plantas provenientes de tubérculos infectados son conocidos como síntomas secundarios; este estado de la enfermedad es el más destructivo. Se evidencia reducción en el tamaño de la planta; presentando las hojas inferiores basales engrosamiento, enrollamiento, textura coriácea con aspecto crujiente y adoptando una forma erecta que aparece en forma progresiva en las hojas nuevas, estos síntomas son menos pronunciados en la parte apical a diferencia de los síntomas primarios. En algunos casos las hojas se tiñen intensamente de púrpura y en otros casos presentan una necrosis severa, en especial en los bordes. (Fernández, 1995; Salazar, 1995; Solorzano, 2006; Cordero, 2008).

Por otro lado, los síntomas en tubérculos son poco frecuentes, salvo algunas variedades susceptibles como *Russet Burbank* y *Green Mountain* que evidencian los síntomas durante su infección primaria y secundaria, observando una decoloración pardusca conocida como necrosis reticulada, y luego se disemina en las células del floema del tubérculo (Solorzano, 2006; Salas, 2007).

## **II.9 Resistencia a virus por mecanismo derivado del patógeno (RDP)**

En 1929 se reportó el primer mecanismo de prevención de las infecciones virales mediante genes provenientes del propio patógeno, esto fue propuesto por McKinney, quien demostró que las plantas de tabaco podían ser protegidas frente a la infección de una cepa muy virulenta del mosaico del tabaco (TMV, *Tobacco mosaic virus*, Género: *Tobamovirus*) si previamente se las había inoculado con una cepa menos virulenta del mismo virus, asignándole el nombre de “protección cruzada” (Nikan y Barker, 2008).

Por otro lado, Fraley *et al.*, (1983) obtienen plantas de tabaco y petunia transgénicas, iniciándose con ello diversas publicaciones que emplean la transferencia de genes foráneos a un gran número de especies de plantas. Sanford y Johnston (1985) fueron los que definieron a la RDP como un mecanismo que por transformación genética

confiere resistencia a un cultivar susceptible a un virus, debido a la expresión del gen del patógeno, alterando así el balance normal de los componentes virales, y pudiendo conducir al impedimento de la replicación o del movimiento del virus dentro de la planta al ser ésta infectada por el virus del cual se deriva el transgen.

El concepto de RDP llegaría a su máxima expresión con las primeras plantas transgénicas resistentes a virus obtenidas por Abel *et al.*, (1986) quienes transformaron a *Nicotiana tabacum* con el gen que sintetiza la PC de TMV. En este caso se postuló que la resistencia se debía al desmantelamiento del virus pues el transgen causó el bloqueo de la expresión de la PC, evitando los diferentes pasos del ciclo de la infección viral, incluyendo la replicación y el movimiento del virus de célula a célula (Abel *et al.*, 1986; Sonoda y Nishiguchi, 2000).

Posteriormente Hemenway *et al.*, (1988) transformaron un cultivar de papa con el gen de PC de PVX, siendo uno de los primeros trabajos en obtener plantas resistentes a un virus de mayor importancia mediante la RDP.

Es así que se inició una nueva etapa en la aplicación e investigación de la RDP a partir del gen de la PC con la finalidad de controlar por transformación genética a enfermedades causadas por otros virus que atacan cultivos de interés comercial (Savenkov y Valkonen, 2001; Mukarami, 2003). Entre estas investigaciones se tienen las recopilaciones de Beachy (1999), además de otros numerosos estudios basados en virus importantes tales como: *Cucumber mosaic virus* (CMV, Familia: *Bromoviridae* , Género: *Cucumovirus*) (Cuozzo *et al.*, 1988), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, Familia: *Potyviridae*, Género: *Potyvirus*), *Watermelon mosaic virus* (WMV, Familia: *Potyviridae*, Género: *Potyvirus*) (Tepfer, 2002), *Papaya ringspot virus* (PRSV, Familia: *Potyviridae*, Género: *Potyvirus*) (Gonsalves, 1998; Sudarshana *et al.*, 2007), *Tomato mosaic virus*

(ToMV, Género: *Tobamovirus*) (Sanders *et al.*, 1992), *Alfalfa mosaic virus* (AMV, Familia: *Bromoviridae*, Género: *Alfamovirus*) (Loesch-Fries *et al.*, 1987).

Destacando la aplicación de esta técnica en papa, se logró obtener la expresión del gen PC en eventos que presentaron altos niveles de resistencia a la infección de los virus: PVY (Kaniewski *et al.*, 1990), PVX (Hemenway *et al.*, 1988), *Potato virus S* (PVS, Familia: *Potyviridae*, Género: *Potyvirus*) (MacKenzie y Tremaine, 1990) y *Potato mop-top virus* (PMTV, Familia: *Potyviridae*, Género: *Potyvirus*) (Barker *et al.*, 1998). En tanto Kawchuk *et al.*, (1990) emplearon la RDP para PLRV en papa, demostrando que las plantas transgénicas acumulaban los transcritos de la proteína de cubierta, sin que la proteína fuera detectada (Scholthof *et al.*, 1993; Mukarami, 2003). Desde entonces más reportes se han orientado hacia el desarrollo de la resistencia al PLRV por transgénesis (Franco-Lara *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2000). No obstante, hasta la fecha las investigaciones basadas en este mecanismo han reportado bajos niveles de resistencia al PLRV (Kawchuk, 1990; Thomas *et al.*, 1997; Vazquez *et al.*, 2001; Ehrenfeld *et al.*, 2004). Se ha logrado disminuir la multiplicación del virus, pero no se ha obtenido una total inmunidad del mismo (Barker *et al.*, 1994). A partir de esto se postula la existencia de una interferencia por parte del transgen en la multiplicación del virus de PLRV a nivel del ARN (Nikan, 2008).

### **II.9.1 Proteína de la cubierta (PC)**

El uso de genes derivados de patógenos ha permitido obtener hasta la fecha una amplia variedad de plantas transgénicas resistentes a diversos agentes virales. El transgen más común derivado del patógeno usado para conferir resistencia, es el gen de la PC (Barker *et al.*, 1998). Esta proteína está prácticamente en todos los aspectos de la multiplicación y diseminación viral, tales como: replicación y encapsidación del material genético, movimiento del virus entre las células y órganos desde una planta infectada a

una sana, así como durante la infección sistémica o en ambos casos; siendo la interacción del virus con el hospedero primordial y vital para su replicación (Thomas *et al.*, 2000; Brault *et al.*, 2002).

Algunos virus de plantas han adaptado su PC para la transmisión por varios vectores, incluyendo artrópodos, nemátodos y hongos, cumpliendo la función de determinar la especificidad para estos vectores (Kaplan *et al.*, 2007).

Por otro lado, el ácido nucléico es protegido por la cápside del virus durante gran parte o todo su viaje de planta a planta, por lo cual algunos virus han adaptado su PC para su transporte por varios tipos de vectores, es por ello que éste es un componente importante y determinante de la especificidad del vector en el movimiento del virus de planta a planta (Gonsalves, 1998).

En el caso del PLRV, esta proteína determina cual es la especie de áfido que puede transmitir el virus. Se conoce en la familia *Bromoviridae*, que la PC tiene un adicional rol en el ciclo del virus, al parecer su transcripción y presencia en la infección es crucial para intensificar los síntomas en la infección por estos virus. Esto se conocería como activación del genoma, relacionándola con la estabilización del genoma viral; la participación en el complejo de replicación y modificación del complejo replicasa de las hebras del genoma del virus, así como su síntesis. En otras investigaciones se demostró que las reducciones de la cantidad de PC bloqueaban la intensidad de los síntomas normalmente observados en virus como *Turnip crinkle virus* (TCV); la cantidad de la proteína sugiere una competencia entre dos o más factores desconocidos que se le integran y están involucrados en la modulación de los síntomas (Callaway, 2001).

## II.9.2 Resistencia viral mediante el mecanismo de ARN de interferencia (ARNi)

En paralelo a las investigaciones en base a la RDP se realizaron otros trabajos que daban indicios preliminares de una correlación entre los altos niveles de protección frente los bajos niveles de acumulación de la proteína de cubierta en las plantas transgénicas.

Este fenómeno se observó también con PLRV, ya que las plantas transformadas con la secuencia nucleotídica de esta proteína presentaban una reducción en la titulación del virus, lo que indicaría que estas plantas transgénicas acumulaban los transcritos de la PC sin poder traducir a proteína (Scholthof *et al.*, 1993).

A mediados de 1990 se iniciaron consecutivas investigaciones que trataban de explicar el fenómeno, adjudicándole el nombre de ARNi. Este mecanismo es una basal y sofisticada red biológica de vías interconectadas que se encuentra en la naturaleza y están involucradas en la defensa del individuo contra el virus y elementos transponibles, así como también participan en el control del desarrollo vegetal (Waterhouse *et al.*, 2001; Kreuze, 2002). En investigaciones con flores de petunia transgénica para el gen endógeno chalcona sintetasa (*chsA*), el cual confiere color púrpura a los pétalos, se observó que se suprimía tanto la expresión del ARNm del propio transgen como del gen endógeno, y en lugar de obtener plantas con la sobreexpresión del transgen para el color púrpura se obtuvieron plantas de color blanco (Napoli *et al.*, 1990), evidenciándose que hay acumulación del ARN sin que se produzca la síntesis proteica (Agrawal *et al.*, 2003). En organismos como hongos se le conoce a este mecanismo con el nombre de *quelling* (Cogoni *et al.*, 1996) en plantas como SGPT o ARNi, y en animales desde *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogasters* hasta ratones, es conocido como ARNi (Fire, 1999).

A su vez Lindbo y Dougherty (1992) fueron los primeros en demostrar la existencia de una relación entre el mecanismo de ARNi y el virus en plantas transformadas,

deduciendo que la infección del virus era capaz de desencadenar el ARNi a partir de la secuencia homóloga viral en la planta transformada para ese mismo virus.

Este mecanismo existe en muchos organismos de forma natural, los indicios demuestran que en una primera instancia las plantas se recuperan ante ciertas infecciones virales, y éstas son resistentes a una posterior reinfección por el mismo virus, o virus cercanos a la misma familia. Por otro lado la evolución de los virus ha llevado a desarrollar mecanismos de defensa que suprimen el ARNi, esto se daría por una coevolución de los mecanismos de defensa y de contra- defensa entre el hospedero y el virus invasor; lo cual ha permitido entender mejor el desarrollo de este mecanismo (Vance y Vaucheret 2001).

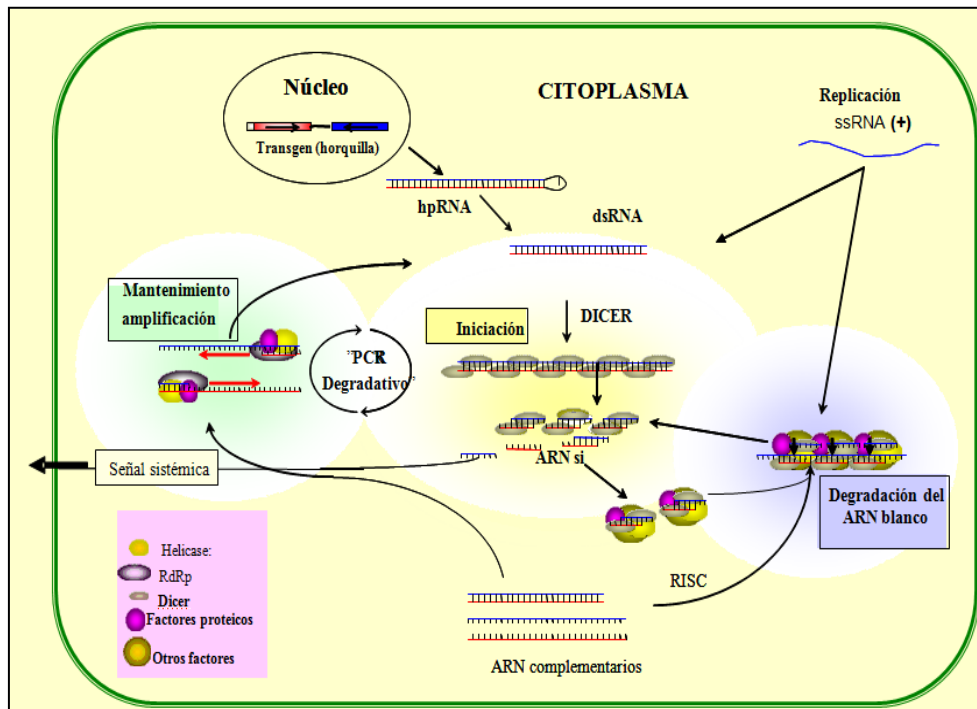
Un aspecto importante es que el ARNi desencadena una respuesta local que luego se puede dispersar de forma sistémica en toda la planta. A su vez está relacionado con la metilación del ADN genómico del transgen, esto ocurre cuando el silenciamiento es inducido por el ARN viral que se replica en el citoplasma, sugiriendo una comunicación existente entre el citoplasma y el núcleo (Vance y Vaucheret 2001; Mlotshwa *et al.*, 2002).

Se ha determinado que el fenómeno de ARNi resulta de la degradación de ARN del gen endógeno y del transgen después de haberse transcrito. Esta degradación post-transcripcional del ARN fue observada en un amplio rango de transgenes expresados en plantas que provenían de bacterias o virus, suceso al que se le llamó SGPT el cual es conocido actualmente como ARNi (Agrawal, 2003).

En definición el ARNi es un tipo de Resistencia Homóloga Dependiente (RHD) que se desarrolla en el citoplasma. El activador de este mecanismo es el ARNdc, que se forma por el plegamiento entre la secuencia del virus y el transgen homólogo a este mismo virus (Samolski, 2004).

El desarrollo del mecanismo puede ser dividido en tres etapas: la iniciadora, efectora (degradación del ARN blanco) y de mantenimiento. En la etapa iniciadora participa la enzima endonucleasa llamada *Dicer*, que reconoce al ARN invasor cortándolo en pequeños fragmentos (21-25 pb) llamados ARNsi (Hamilton y Baulcombe, 1999; Bernstein *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001). Posteriormente en la etapa efectora los fragmentos son capturados por el complejo proteico llamado RISC, el cual separa la doble hebra de los ARNsi, actuando estas hebras individuales como moldes que se acoplarán al ARNm homólogo, degradándolo e impidiendo su traducción a una proteína funcional (Pickford y Cogoni 2003). A su vez, en la etapa de mantenimiento, participa el complejo RdRp, sintetizando más estructuras de ARNdc, lo cual consiste en la complementariedad entre la cadena de ARNsi, como cebador a la hebra de ARNm antisentido del virus, que actuaría como un molde, de tal forma que la señal de silenciamiento se reamplificará a partir de una especie de “PCR degradativo” (Fig.2) (Kreuze, 2002, 2005; Samolski, 2004). Se sabe que la señal de silenciamiento no sólo se restringe a las células individuales, sino también puede propagarse a través de plasmodesmos o floema, hacia las células y tejidos alejados, de esta forma reciben el mensaje convirtiéndose en una nueva fuente de señal. Este fenómeno se conoce como SAS, el cual permite a los tejidos de la planta captar la señal y mantener activo el mecanismo de ARNi (Fig.2) (Palauqui *et al.*, 1997; Waterhouse *et al.*, 2001; Vazquez *et al.*, 2001; Vaucheret *et al.*, 2001, Samolski, 2004; Solorzano, 2006).

Este mecanismo puede ser inducido en plantas transformadas con constructos de tipo antisentido o cosupresión, pero estas técnicas resultan ser laboriosas e impredecibles, parciales o inestables, siendo dependientes de la presencia de múltiples copias, y presentando una máxima frecuencia de resistencia igual o menor al 20% (Smith *et al.*, 2000; Waterhouse *et al.*, 2001; Bucher *et al.*, 2006).



**Figura 2:** Posible modelo para los mecanismos de ARNi en plantas. Modificado a partir de Kreuze 2002.

Una alternativa ante estas limitantes es el empleo de las construcciones que contengan la orientación sentido y antisentido del transgen a la vez, pero separadas por la secuencia de un intrón, el cual facilitará la formación de estructuras en forma de horquilla con un lazo, durante la formación del transcrito primario (Wesley *et al.*, 2001). La inducción del ARNi por un transgen tipo *hairpin* ARN (hpARN) fue demostrada por primera vez usando el gen reportero GUS en arroz (Waterhouse y Helliwell, 2003), esta construcción produjo eventos transformado con una sola copia del hpARN, siendo esto suficiente para inducir inmunidad a la infección viral en plantas, con casi el 100% de eficiencia y estabilidad del mecanismo de ARNi dirigido hacia los virus (Smith *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Kalantidis *et al.*, 2002; Tenllado *et al.*, 2004). La secuencia del intrón provee estabilidad al ARN, pero es eliminado durante el procesamiento del *splicing*, produciendo una horquilla de ARN sin el lazo. Se piensa que la presencia del intrón aumenta la eficiencia del silenciamiento ya que el proceso de su escisión puede ayudar en el alineamiento de los brazos complementarios de las horquillas en un ambiente que



favorece la hibridación del ARN, promoviendo así la formación de una cadena de ARN de doble hebra. Entre otras ventajas se tiene que este tipo de transgen minimiza riesgos medioambientales y epidemiológicos que suelen estar asociados con cultivos transgénicos en plantas que expresen genes virales, estos podrían ser: recombinación, transcapsidación (encapsidación heteróloga), y sinergismo entre el ARN del transgen y el ARN viral; adicionalmente en este mecanismo no se sintetizan proteínas y los niveles de ARNm son muy bajos, por ello no se daría el flujo génico del transgen entre los organismos (Kreuze, 2002; Wang y Waterhouse, 2002; Tenllado *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2009). Esta técnica se ha empleado en una diversidad de virus tales como PVY (Smith *et al.*, 2000, Missiou *et al.*, 2004), CMV (Kalantidis *et al.*, 2002; Chen, 2007), BNYV (Lennefors *et al.*, 2006), incluyendo los luteovirus: BYDV (Wang *et al.*, 2000) y SbDV (Tougou *et al.*, 2006).

Es por ello que en estos últimos 10 años la biología molecular ha redescubierto la utilidad del mecanismo de ARNi, siendo su contribución significativa en el diseño de nuevas estrategias para combatir enfermedades virales, ofreciendo una combinación de extrema especificidad, y el aprovechamiento de una estrategia celular fundamental que aparentemente ha evolucionado naturalmente con este propósito. Estos antecedentes sustentan la necesidad de evaluar y validar este mecanismo alternativo de resistencia mediada por ARN.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

**III.1 Material biológico:** Se analizaron los eventos transgénicos Desiree [hpPLRV-ARNsi]: 17, 31, 34, 38, 40, 47, 50, 54, 56, 68; de la colección de plantas transgénicas del CIP, con número de accesoión 820034.

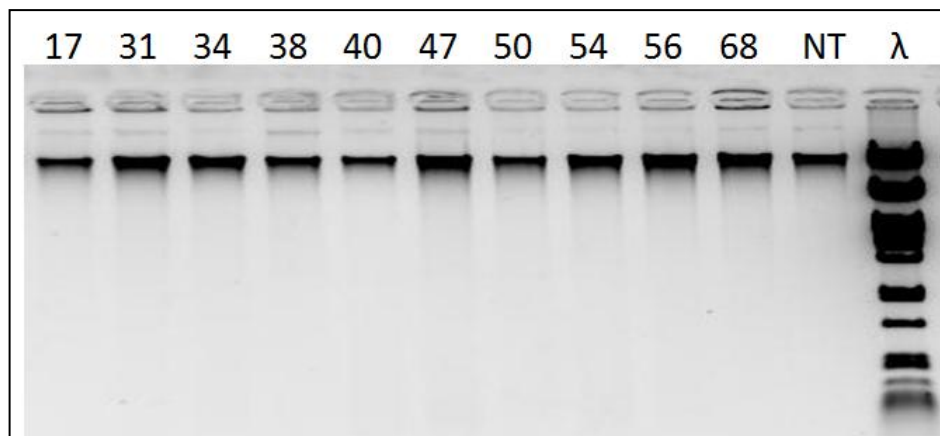
#### III.2 Métodos

##### III.2.1 Extracción de ADN

El protocolo que se usó fue descrito por Ñopo y Ghislain (2004), la estandarización se realizó en el Laboratorio de Clonamiento Genético de la división de Biotecnología Aplicada del CIP.

4. Se molió 4 g de tejido de hojas con nitrógeno líquido en un mortero, posteriormente la muestra fue almacenada en un tubo (Corning® de 50 ml) y mezclada con 20 ml de tampón de extracción CTAB (anexo 1), adicionando 200µl de 2-mercaptoetanol.
5. La muestra fue homogenizada vigorosamente he incubada en baño maría a 65°C por 20 min, posteriormente se mantuvo en medio ambiente hasta que se enfrió por 10 min.
6. Se adicionó 20 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló suavemente por 5 min, la mezcla fue centrifugada a -4°C y 5,000 rpm por 20 min.
7. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo (Corning® de 50 ml), repitiéndose una vez más el paso anterior, posteriormente al sobrenadante obtenido se adicionó 15 ml de isopropanol frío, mezclándolo suavemente por inmersión y se incubó a -20°C por 1 h ó -70°C por 30 min.

8. Pasado este tiempo, se centrifugó la muestra a  $-4^{\circ}\text{C}$  y 5,000 rpm, por 20 min, el sobrenadante fue descartado.
9. Se dejó secando el *pellet* a temperatura ambiente por 5 min.
10. Posteriormente el *pellet* fue trasladado a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, para lavarlo, el primer lavado fue con 300  $\mu\text{l}$  de la solución I por 5 min, luego el *pellet* se pasó a un segundo tubo con 300  $\mu\text{l}$  de la solución de lavado II por 1 min (anexo 1).
11. Finalmente se resuspendió el *pellet* en un volumen entre 100 – 150  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas estéril, y una vez que fue totalmente disuelto el ADN se le añadió 1  $\mu\text{l}$  de la enzima ARNsa (10 mg/ml) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 min, para digerir el ARN que estuviera en la muestra.
12. Para evidenciar la calidad de la muestra extraída de ADN, se empleó 1  $\mu\text{l}$  de ADN de la muestra con 9  $\mu\text{l}$  de tampón de corrida Salb 10X (anexo 4), y como marcador de corrida se usó ADN del fago lambda digerido con la enzima *Pst*I. La corrida electroforética se hizo en un gel de agarosa al 1% con el tampón TBE (1X), la tinción de las bandas fue con bromuro de etidio (0.01%) (anexo 4).
13. El gel fue expuesto a luz UV (Stratagene, UV Stratalinker 240) y se tomó una foto digital que fue visualizada con el programa EpiChemi3 Darkroom (Fig.3)
14. Se confirmó la concentración y pureza de las muestras por las medidas de absorbancia en un espectrofotómetro (Sambrook, 2001).



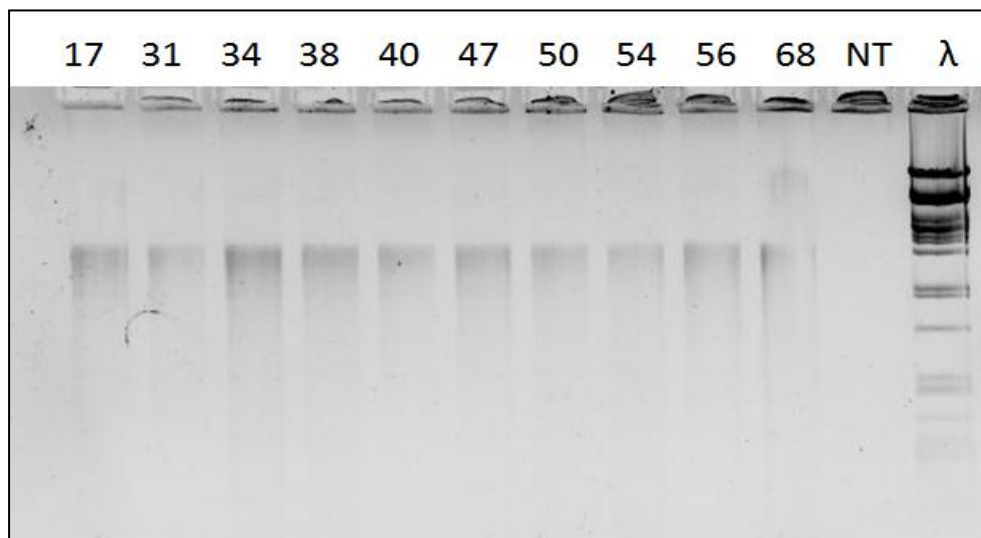
**Figura 3:** Calidad de la extracción de ADN de los diez eventos transformados, NT: no transformado, λ: marcador λ/PstI.

### III.2.2 Southern Blot

El protocolo que se describe a continuación fue elaborado por Ñopo y Ghislain (2004).

#### III.2.2.1 Digestión y electroforesis de las muestras

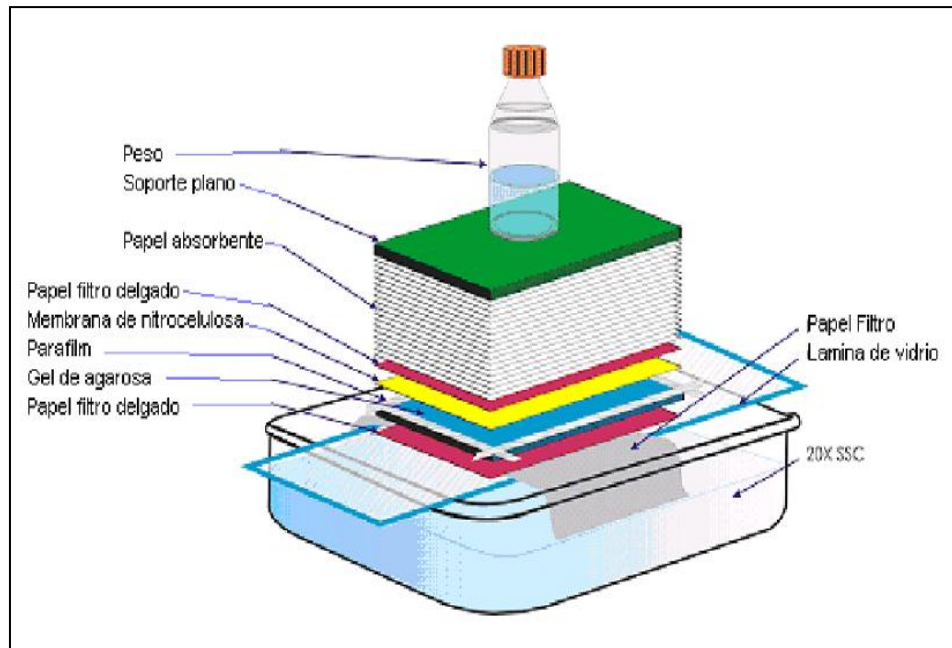
1. Se digirió 20 µg de concentración de ADN, en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, adicionando 5 µl de la enzima de restricción *EcoRI* (60 U) más 10 µl del buffer de la enzima, completando la reacción con agua libre de nucleasas a un volumen final de 100 µl. Se incubó las muestras para su digestión a 37°C durante 24 h.
2. Las muestras digeridas luego fueron corridas en un gel al 0,8% de agarosa con un tampón de carga 1X, como marcador de peso molecular de concentración, se corrió 1 µg de ADN del fago λ digerido con la enzima *PstI*.
3. Para la sonda (control positivo del marcaje) se empleó el producto del amplificado por PCR (anexo 7) del gen de PC con la concentración de 200 pg.
4. La corrida se realizó a 20 V durante toda la noche, para que las muestras corrieran de forma lenta y los fragmentos digeridos tengan una mejor separación. Finalizada la corrida electroforética se verificó la separación de las bandas (barrido) observando el gel en un transiluminador de luz UV (Fig.4).



**Figura 4:** Digestión enzimática con *EcoRI* de la extracción de ADN de los diez eventos transformados, NT: no transformado, λ: marcador λ/PstI.

### III.2.2.2 Transferencia de *Southern Blot*

El ADN del gel de agarosa fue transferido a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond<sup>TM</sup> – N+, Amersham), siguiendo el protocolo descrito en el anexo 2 (Fig.5). Al finalizar la transferencia se fijó el ADN a la membrana mediante exposición a luz UV en un equipo especial llamado Crosslinker<sup>®</sup> (Stratalinker 2400, Stratagene). Luego la membrana se secó en un horno a 80°C durante 2 h y al final fue guardada y cubierta con papel filtro a temperatura ambiente hasta el momento de la hibridación.

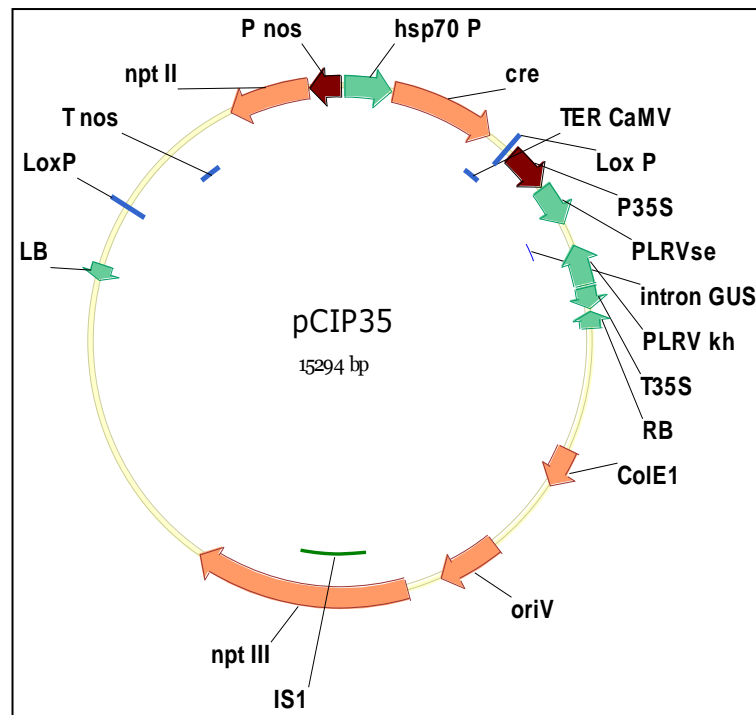


**Figura 5.-** Diagrama del sistema de transferencia para el *Southern Blot* (CIP, 2007).

### III.2.2.3 Preparación y cuantificación de la sonda

Se extrajo el plásmido pCIP35 (Fig.6) de la bacteria *E. coli* DH5 $\alpha$ , con el Kit Wizard<sup>®</sup> plasmid extraction de Promega<sup>®</sup>, posteriormente se sintetizó la sonda a partir de este plásmido por PCR (anexo 7) obteniendo el amplicón de 400 pb correspondiente al fragmento sentido de PC-PLRV. El par de secuencias de los iniciadores usados fue:

- Sentido: 5' - AAA GGA TCC TTG TAC CAG CTG ATA TAA TCA -3'
- Antisentido: 5'- AAA GAG CTC GTC CAC CAA AAA CGT AAG CG -3'



**Figura 6: Representación esquemática del plásmido pCIP35.**

LB, RB. Borde izquierdo y borde derecho respectivamente; *loxP*, sitios para el reconocimiento de la recombinasa, *T nos*, terminador del gen de la nopalina sintasa, *nptII*, gen neomicina fosfotransferasa II o de resistencia al antibiótico kanamicina, *P nos*, promotor nos; *hsp70*, promotor *hsp70* de *Drosophila melanogaster*; *cre*, recombinasa *cre*; *Ter CaMV*, terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor, *P35S* promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, *PLRVse*, fragmento sentido del virus PLRV; intron GUS, secuencia intrónica del gen glucoronidasa; *PLRVkh*, fragmento antisentido del PLRV (Vector NTI Advance® 9 software).

#### III.2.2.4 Marcaje de la sonda

Para el marcaje de la sonda se usó  $^{32}\text{P}$ . Este método de marcaje es de tipo radiactivo, el cual cuenta con una alta sensibilidad para detectar concentraciones muy bajas de ADN. Sin embargo hay que tener un cuidado especial y condiciones adecuadas en el manejo de este tipo de sustancias. La manipulación directa del  $^{32}\text{P}$  fue realizada por personal autorizado y acreditado para estos fines.

Para el marcaje se utilizó el kit Amersham Pharmacia Biotech<sup>®</sup>. Esto consiste en que los nonámeros de secuencias aleatorias, funcionan como cebadores para la síntesis de ADN a partir de un molde de ADN desnaturalizado (simple hebra), esta reacción es catalizada por el fragmento Klenow (sin actividad exonucleasa) de la enzima ADN polimerasa I de *E. coli*. Posteriormente se agregó el <sup>32</sup>P que a través de un periodo de incubación a 37°C se unirá a la sonda. Esta sonda marcada fue desnaturalizada por alta temperatura antes de hibridar con el ADN de las muestras.

### **III.2.2.5 Hibridación**

Antes de la hibridación del ADN con la correspondiente sonda marcada, éste fue sometido a un proceso llamado pre-hibridización, el cual consiste en someter la membrana que contiene las muestras a 65°C por 15 min en un tampón de pre-hibridización (Amersham Rapid-hyb Buffer), a un volumen suficiente como para cubrir la membrana. Este procedimiento permitió que el ADN de las muestras esté disponible para hibridar con la sonda.

Después del proceso de pre-hibridización, se agregó la sonda marcada y se procedió a la hibridización por 65°C durante toda la noche. Al día siguiente la membrana fue lavada con la solución I: 2X SSC y 0.1 % SDS y la solución II: 0.1X SSC y 0.1 % SDS, las cuales tiene la función de remover los restos de sonda y reactivos en exceso.

### **III.2.2.6 Detección**

La detección se hizo a través de la exposición de películas fotográficas con las membranas marcadas radioactivamente en los sitios donde se haya hibridado. De esta manera se pudo localizar las señales radioactivas.

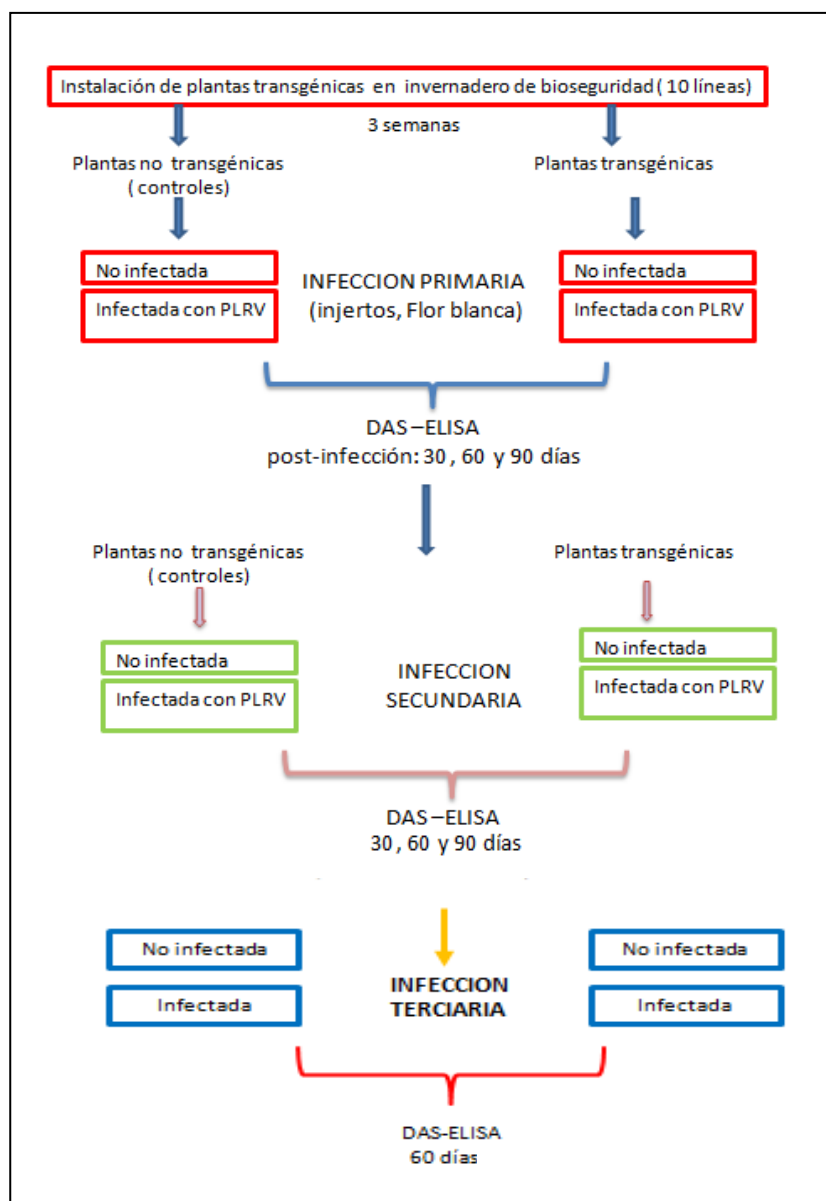
La película y la membrana fueron expuestas por 24 h a una temperatura de -70°C antes de revelar. El revelado de la película se realizó colocando la película primero en



una solución reveladora (Kodak GBX, Sigma) por 2 min, hasta que se observó la aparición de bandas momento en el cual se enjuagó con agua para finalmente transferirla luego a la solución fijadora (Kodak GBX, Sigma) por 2 min, hasta que se aclaró la película, y finalmente se volvió a enjuagar con agua para su posterior secado a temperatura ambiente.

### **III.3 Introducción y propagación de las plantas transgénicas de papa a invernadero**

Las plántulas de papa transformadas con el plásmido pCIP35 (número de accesión 820034), cuyos eventos fueron: Desiree [hpPLRV- ARNsi]: 17, 31, 34, 38, 40, 47, 50, 54, 56, 68, y su control no transformado, mantenidas en condiciones *in vitro* (medio MSA de propagación en tubos de vidrio, sales Murashige y Skoog, 4.6 g, Solución base MSA (anexo 6) se introdujeron con 5 repeticiones por evento al invernadero de bioseguridad del CIP, siendo las condiciones medioambientales de temperatura: 17-22°C, porcentaje de humedad: 70, y exposición de 12 h luz con 12 h de oscuridad. Las plantas de *in vitro* fueron sembradas en un sustrato para enraizamiento, Jiffy-7, durante aproximadamente 2 semanas, y luego trasplantadas a macetas de plástico de 6" conteniendo una mezcla de arena, tierra y musgo en la proporción volumétrica de 1:1:1 esterilizada al vapor. Luego de 3 meses se obtuvieron tubérculos que fueron inducidos a producir brotes en una cámara de brotamiento especial a 28°C (Fig.7).



**Figura 7: Protocolo del ensayo de infección en invernadero.** Las plantas transformadas y sus controles se evaluaron durante la infección primaria (30, 60 y 90 dpi) y secundaria (30, 60 y 90 días de sembrar). En el caso de la infección terciaria fue a los 60 días de sembrar.

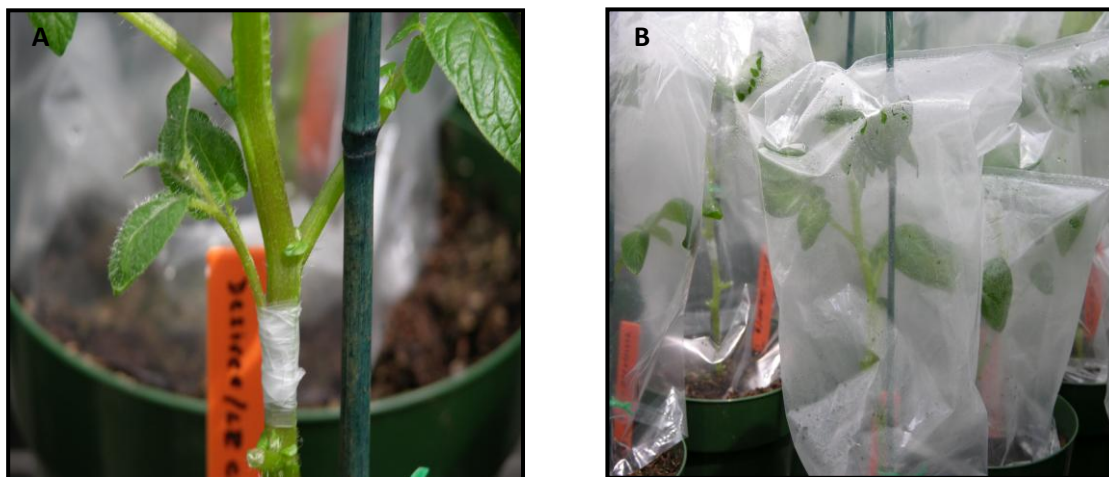
#### III.4 Obtención de fuente de inóculo

Para transmitir el virus de PLRV se usaron injertos provenientes de la planta indicadora *Flor Blanca* (variedad susceptible al virus PLRV), proporcionada por el Departamento de Patología del CIP.

El inóculo se propagó utilizando tubérculos de la segunda generación vegetativa de la planta indicadora (infectada con PLRV), debido a que en esta generación los síntomas son más notorios y el desarrollo de la enfermedad es más agresivo. Se evaluó por DAS-ELISA la presencia de PLRV y se observaron los síntomas característicos del virus, comprobando que las plantas estaban infectadas. Para obtener una mayor cantidad de fuente del inóculo, durante el crecimiento de estas plantas, se realizaron cortes de los meristemos apicales estimulando el crecimiento de los meristemos laterales y obteniendo más ápices, los cuales sirvieron como injertos.

### **III.5 Infección con injertos**

Luego de la inserción de las plantas de *in vitro* a invernadero se esperó por 3 meses la formación de tubérculos, éstos fueron sembrados y a las 3 semanas de edad se infectaron con injertos (ápices de la Flor blanca) insertados en forma de cuña, en una escisión oblicua (0,5–1 cm) en el tallo de la planta que se infectó. Las zonas de unión fueron selladas y envueltas con Parafilm M (Sigma), para fijar el injerto. Las plantas fueron cubiertas con una bolsa plástica húmeda (cámaras frías) por tres días para evitar la desecación (Fig.8). Posteriormente se realizaron los ensayos de DAS-ELISA en los periodos de tiempo: 30, 60 y 90 dpi. Luego de obtener tubérculos de esta primera infección, llamada infección primaria, éstos fueron sembrados para evaluar los síntomas y detectar el PLRV por DAS-ELISA durante la infección secundaria, comprendiendo la evaluación a los 30, 60 y 90 días de siembra.



**Figura 8: Infección por injertos.** (A) infección de las plantas con injertos de *Flor blanca*, uniones selladas con parafilm. (B), conservación de las plantas injertadas, en cámaras frías.

### III.6 Evaluación de síntomas

Se observaron las características morfológicas de las plantas transgénicas, durante la infección secundaria, otorgando valores numéricos de acuerdo a la severidad que se presentaba. El valor 1 correspondía a una planta sana, 1.5-2 planta con síntomas leves,  $2 \geq$  planta con síntomas severos y 3 la muerte de la planta, estas plantas siempre fueron comparadas con los controles no transformados no infectados e infectados. Estas evaluaciones fueron realizadas durante 30, 60 y 90 días de siembra.

### III.7 Prueba serológica

#### III.7.1 DAS-ELISA

La técnica que se ejecutó fue estandarizada por el laboratorio de Serología del departamento de Patología del CIP. Su descripción es la siguiente (Fig.9):

#### **III.7.1.1 Sensibilización de placas**

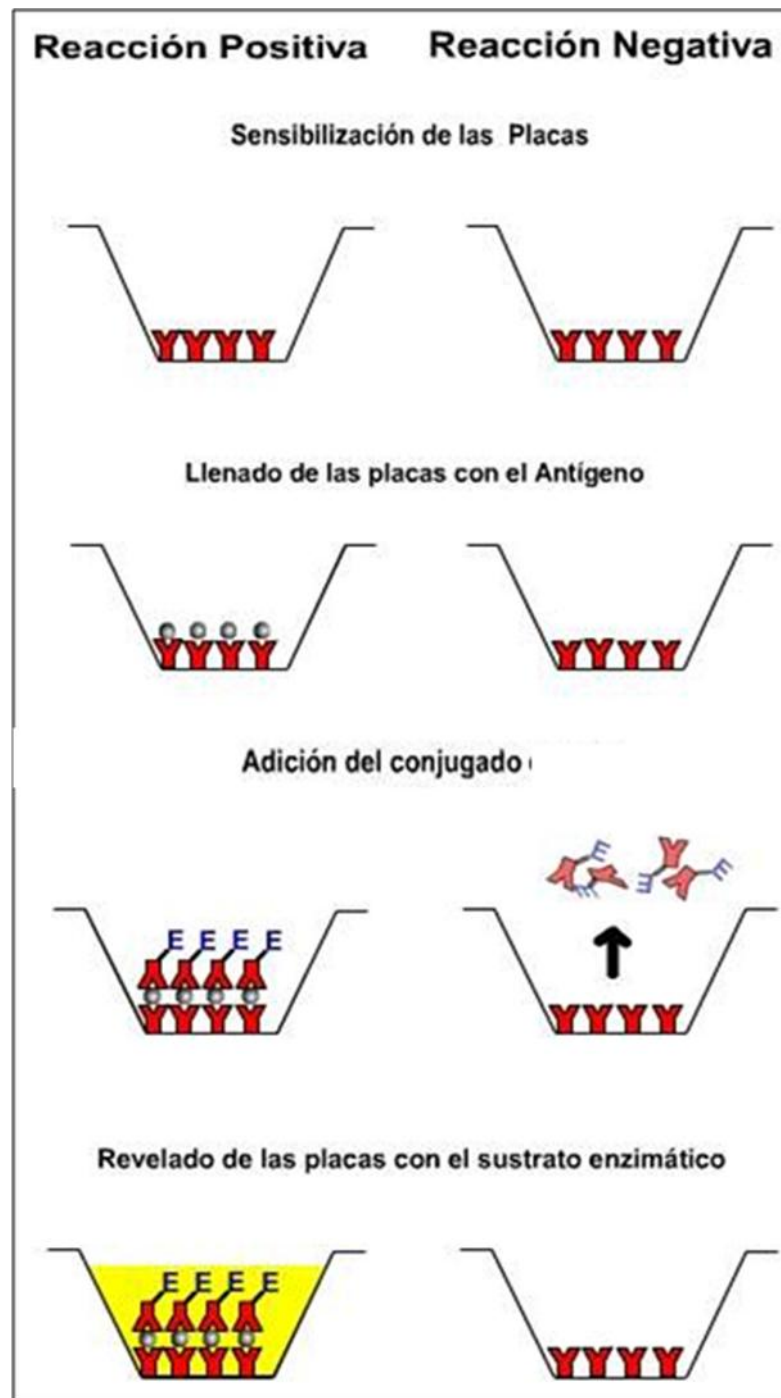
Cada pocillo de fondo plano de la placa de microtitulación fue recubierto con 100  $\mu\text{L}$  de la IgG-PLRV (1: 1000) diluido en tampón carbonato (0.293%  $\text{NaHCO}_3$  y 0.159%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 4 h. Luego se realizaron tres lavados cada 3 min con tampón fosfato (PBS, 0.8%  $\text{NaCl}$ , 0.02%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.115%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.02%  $\text{KCl}$ ) a pH 7.4, conteniendo 0.05% *Tween*-20.

#### **III.7.1.2 Adición de las muestras**

Se colectaron muestras (foliolos) de la parte baja, media y apical de la planta, y se trituraron en un tampón de extracción PBS-T con 2% PVP y 1% de albúmina de huevo, cada hoyo de la placa se llenó con 100  $\mu\text{L}$  del extracto obtenido de cada muestra, posteriormente se incubó a  $4^\circ\text{C}$  durante toda la noche. Luego se realizaron nuevamente tres lavados con PBS-T hasta que la placa quedó completamente transparente.

#### **III.7.1.3 Adición del conjugado (fosfatasa alcalina-IgG)**

El conjugado enzimático (IgG-AP) para PLRV (1: 1000) se diluyó en PBS-T conteniendo 2% PVP y 0.2% de Albúmina de huevo o leche en polvo, y se agregó 100  $\mu\text{L}$  de esta solución a cada pocillo, luego la placa fue incubada a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 h, y finalmente fue lavada 3 veces con PBS-T.



**Figura 9: DAS-ELISA.** Representación esquemática de la detección de plantas infectadas con PLRV (Cabrera, 2007).

#### **III.7.1.4 Adición del sustrato enzimático**

Se preparó el tampón sustrato a 0.5 mg/ml (P-nitrofenilfosfato en tampón dietanolamina a pH 9.8), agregando 100 µL de éste a cada pocillo de la placa la cual se dejó reaccionando por 1 h con el reactivo, luego se hizo una lectura de absorbancia a 405 nm en un equipo colorimétrico (Bio-Rad), siendo las muestras positivas de color amarillo y los negativos transparentes. Finalmente estos resultados fueron evaluados con ayuda del *Software Microplate Manager Application*.

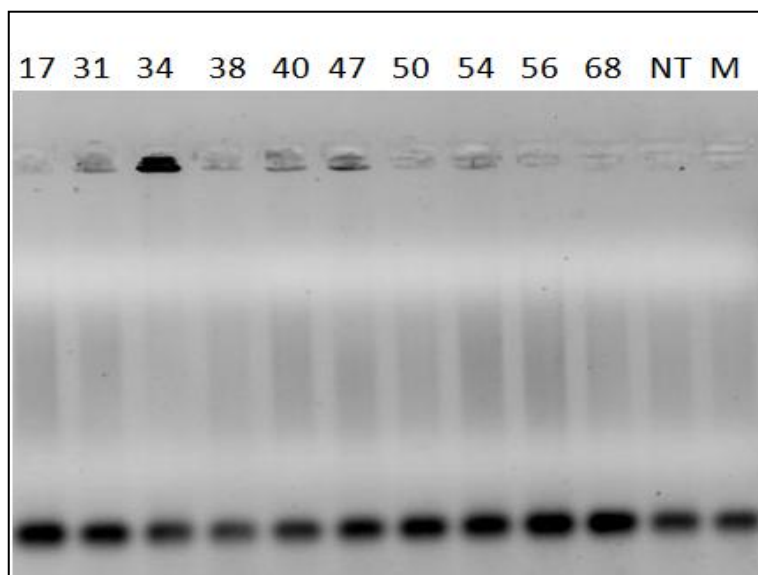
#### **III.8 Extracción de ARNsi**

Se usó el protocolo de Samolski (2004), estandarizado en el laboratorio de clonamiento genético de la división de Biotecnología Aplicada del CIP.

1. Se molió 4 g de tejido de hojas (30 µg), con nitrógeno líquido, las muestras fueron colectadas durante la infección secundaria.
2. Se mezcló cada muestra molida con 10 ml de Trizol<sup>®</sup> frío, luego se centrifugó a -4°C y 5,000 rpm por 20 min.
3. El sobrenadante se transfirió a 4 tubos de 2 ml c/u con 400 µl de cloroformo, se mezcló suavemente c/u y se centrifugó a 12,000 rpm en una centrifuga de -4°C por 5 min.
4. Se repartió el sobrenadante de color rosado a nuevos tubo de microcentrífuga de 2 ml que contenían 700 µl de isopropanol frío.
5. Las muestras fueron mantenidas a -20°C por 1 h, para precipitar todo el ARN; después se centrifugó a 12,000 rpm a -4°C por 25 min, el sobrenadante fue descartado y se enjuagó el *pellet* con 1ml de alcohol al 75% diluido en agua DEPC estéril.

6. Se dejó secando el *pellet* a temperatura ambiente por 10 min, luego se resuspendió en un volumen de 150 µl de agua DEPC estéril complementada con 150 µl de LiCl (9M) (preparado con agua tratada con DEPC), se dejó la mezcla de un día para otro a -20°C.
7. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a -4°C y 2,000 rpm por 15 min, separando el sobrenadante (ARNt y ARNsi) a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 ml con 800 µl de isopropanol (Merck) frío a -20°C por 1 h, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm a -4°C por 30 min.
8. El *pellet* fue resuspendido con 100 µl agua DEPC estéril (Invitrogen®) y finalmente se almacenó a -70°C.
9. Se evaluó la concentración y calidad de las extracciones mediante una corrida electroforética en un gel al 2% de agarosa con bromuro de etidio (0.01% del gel) en un tanque de electroforesis con tampón TBE (1X) diluido con agua DEPC estéril. El volumen de la muestra que se corrió fue 1 µl más 1 µl de tampón de corrida (2X) (anexo 4), el marcador de tamaño molecular que se usó fue siRNA, NEB-Biolabs®. El gel fue expuesto a luz UV y se tomó una foto con el programa EpiChemi-3 Darkroom (Fig.10). Las concentraciones fueron medidas con una maquinaria especial llamada Nanodrop (Fisher).





**Figura 10.** Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% de ARNsi de los diez eventos, NT: no transformado, M: marcador, siRNA, NEB-Biolabs®.

### III.9 Obtención del control positivo por agroinfiltración

Se modificó el método de Agroinfiltración descrito por Medrano *et al.*, 2008. Este método permitió obtener un control positivo de ARNsi para el *Northern Blot*. Consiste en sembrar la cepa bacteriana EHA 105 de *A. tumefaciens* que contenía el plásmido pCIP35 en medio LB (30 ml) (anexo 5), suplementado con kanamicina (100 µg/ml) y rifampicina (100 µg/ml) (anexo 6) para evitar cualquier tipo de contaminación. Se midió la DO de la bacteria entre 0.4-0.6 a 620 nm en un espectrofotómetro. Posteriormente se centrifugó el caldo, y luego se resuspendió el *pellet* obtenido en un tampón que contenía: MgCl<sub>2</sub> (10 mM) y acetosiringona (150 mM) (anexo 6) en 50 ml de agua destilada, posteriormente se homogenizó la suspensión por tres horas a temperatura ambiente. Se empleó 10 ml de esta mezcla en una jeringa, haciendo la inoculación en el envés de la hoja de la planta *Nicotiana benthamiana*, con la fricción del émbolo y diseminando el inóculo en el mesófilo de la hoja (Fig. 11).

Luego de la inoculación se mantuvieron las plantas en el invernadero de bioseguridad a condiciones controladas (16 h luz, 8 h oscuridad, 65% de humedad y una temperatura entre 21 – 25°C). Finalmente, se colectaron las hojas y se extrajo el ARNi según el paso III.8 de *Extracción de ARNi*.



**Figura 11: Agroinfiltración.** Inoculación y diseminación de la resuspensión de la bacteria *A. tumefaciens* en un tampón de agroinfiltración en el envés de la hoja de *Nicotiana benthamiana*.

### III.10 Northern Blot

El protocolo que se describe a continuación fue descrito por Samolski (2004), CIP.

#### III.10.1 Corrida electroforética en gel de poliacrilamida

Se desnaturalizó las muestras a 100°C por 5 min y se conservaron en hielo hasta el momento de realizar la corrida.

1. El gel se preparó con bis-poliacrilamida (24:1) de 15% TBE-Urea (anexo 4), y la corrida se hizo en una cámara de electroforesis vertical, esto consiste en ensamblar

los vidrios con los peines en la cámara, adicionar la solución de bis-poliacrilamida, con 10% de APS y TEMED para la polimerización, (Fig.12).

2. Se realizó una pre- corrida del gel sin muestras a 80V por 30 min, siendo los pocillos enjuagados con ayuda de una aguja hipodérmica y con el tampón de corrida TBE 1X (preparado con agua tratada con DEPC) para evitar la formación de burbujas.
3. Las muestra que se usaron en la corrida tuvieron una proporción de 1:1 con el tampón de carga TBE-Urea Sample Buffer (Bio-Rad) en un volumen final de 30 µl y como marcador de peso molecular se usó el RNAsi *marker* de 21-25 pb (Invitrogen®).
4. Las condiciones de la electroforesis fueron: 600 V, 21mA y 12W, siendo 3 h el tiempo total de la corrida.
5. Finalizada la corrida se extrajo el gel y se procedió a enjuagarlo por unos minutos en un tampón 20X SSC tratado con DEPC, después se procedió al armado del sistema de transferencia a una membrana de nylon (HybondTM – N +, Amersham) (Sambrook, 2001).
6. Al día siguiente se retiró la membrana y se enjuagó por unos segundos en un tampón 2X SSC, diluido en agua DEPC. Al finalizar la transferencia se fijó el ARN a la membrana mediante exposición a luz UV en el equipo Crosslinker (Stratalinker 2400, Stratagene).
7. La membrana fue secada durante 2 h en un horno a 80°C, se guardó y cubrió con papel de filtro a temperatura ambiente hasta el momento de su hibridación. En paralelo el gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio, para comprobar que la transferencia del ARN este completa.



**Figura 12:** Corrida electroforética de gel de bis-acrilamida.

### III.10.2 Preparación y marcaje de la sonda

La sonda marcada que se usó para el *Northern Blot*, fue obtenida a partir de la transcripción *in vitro* del plásmido pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector (Invitrogen<sup>®</sup>), el cual contenía el gen de PC-PLRV. El plásmido fue digerido con la enzima *NdeI*, mediante la incorporación de  $\alpha^{32}$  P-UTP por la enzima T7 ARN polimerasa. Luego de chequear la correcta digestión del plásmido, se mezcló los siguientes reactivos en un tubo de microcentrífuga:

Tampón T7 5X	5 $\mu$ l
DTT	2,5 $\mu$ l
Mezcla de ATP-CTP-GTP (2,5 mM)	5 $\mu$ l
ADN plasmídico digerido (300 ng/ml)	5,5 $\mu$ l
Inhibidor de ribonucleasas	1 $\mu$ l
$\alpha^{32}$ P-UTP (10 mCi/ml)	5 $\mu$ l
T7 ARN polimerasa (20 U/ml)	1 $\mu$ l

Se incubó la mezcla a 37°C por 1 h, y luego se adicionó 1 µl de DNAsa libre de RNAsa (1 U/ml); se dejó incubando a la misma temperatura durante 15 min más. Se retiró el tubo de microcentrífuga de la incubadora y se le agregó 2,5 µl de acetato de potasio 3M pH 4,8 y 82 µl de etanol absoluto. Se dejó precipitar el ARN a –20°C por 1 h, luego se centrifugó por 20 min y se descartó el sobrenadante (el cual contenía a los nucleótidos que no fueron incorporados). Posteriormente se lavó el precipitado de ARN marcado con 200 µl de etanol 70% y se dejó secando a temperatura ambiente por 5 min. El *pellet* fue resuspendido en 50 µl de agua diluida en DEPC.

Para dividir la sonda en pequeños fragmentos y se pueda hibridar con los ARNs fue hidrolizada a 60°C por la adición del mismo volumen de tampón carbonato 2X pH 10,2 (anexo 4).

La incubación se realizó durante 3 h, este tiempo se estimó a partir de un tamaño promedio final de 50 nucleótidos, según lo calculado mediante la siguiente fórmula:

$$t = \frac{-Li - Lf}{K * Li * Lf}$$

Donde:

t = tiempo (min)

K = constante (0,11 kb/min)

L<sub>i</sub> = longitud inicial de la sonda

L<sub>f</sub> = longitud final de la sonda

### **III.10.3 Pre -hibridación e Hibridación**

Se colocó la membrana de nitrocelulosa dentro de un tubo de vidrio y se cubrió con 10 ml de tampón de pre hibridación (anexo 3), el tubo se mantuvo por 2 h a 37°C dentro de un horno. Antes de adicionar la sonda marcada se retiró este tampón (pre hibridación) y se agregó la misma solución con el mismo volumen (hibridación). Se dejó hibridando a 37°C durante toda la noche con la sonda.

A la mañana siguiente se descartó el tampón de hibridación y se lavó 3 veces agregando al tubo el tampón SSC 5X/SDS 0,1%, cada lavado se realizó a 37°C por 15 min.

### **III.10.4 Detección**

Luego se retiró el exceso del tampón de la membrana lavando el tubo de hibridación, y se envolvió cuidadosamente con plástico transparente (Brand Plastic Film, Saran® Wrap). Con el lado del ARN hacia arriba, la membrana cubierta fue colocada dentro de un casete para las autorradiografías (Hypercasette™, Amersham) y en un cuarto oscuro se colocó una película de rayos X sobre ésta (Hyperfilm™, Amersham), se mantuvo este casete a -70°C durante 3 días.

El revelado de la película se realizó colocándola en una solución reveladora (Kodak GBX, Siga) hasta que se observó la aparición de bandas, momento en el cual se enjuagó con agua para finalmente ser transferida a una solución fijadora (Kodak GBX, Sigma) hasta que se aclaró la película, finalmente se volvió a enjuagar con agua y se dejó secando a temperatura ambiente.

### **III.10.5 Análisis de datos**

La densidad relativa de las bandas que se obtuvieron en las membranas reveladas fueron analizadas con el programa *ImageJ* 1.44p (<http://imagej.nih.gov/ij>).

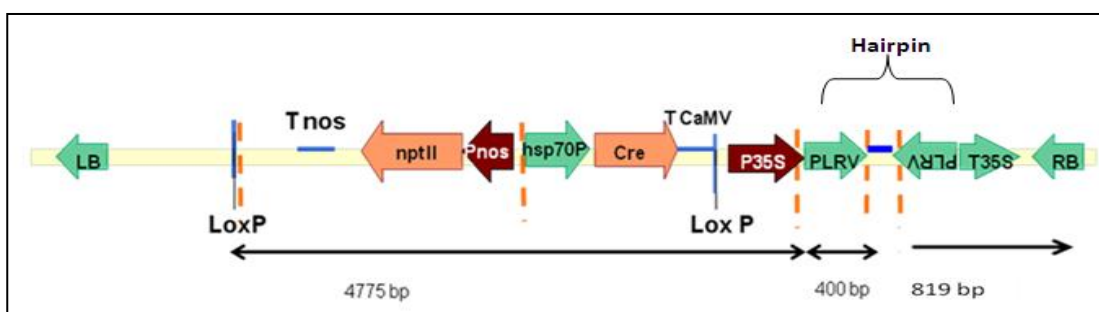
Los valores se obtuvieron en función de la relación entre las densidades relativas de la carga de las muestras correspondientes a 28S rARN y ARNsi respectivamente, considerándose los valores finales como densidades relativas ajustadas y representadas con porcentaje (%).

## IV.RESULTADOS

### IV.1 Caracterización molecular de plantas transformadas

#### IV.1.1 Hibridación por *Southern Blot*

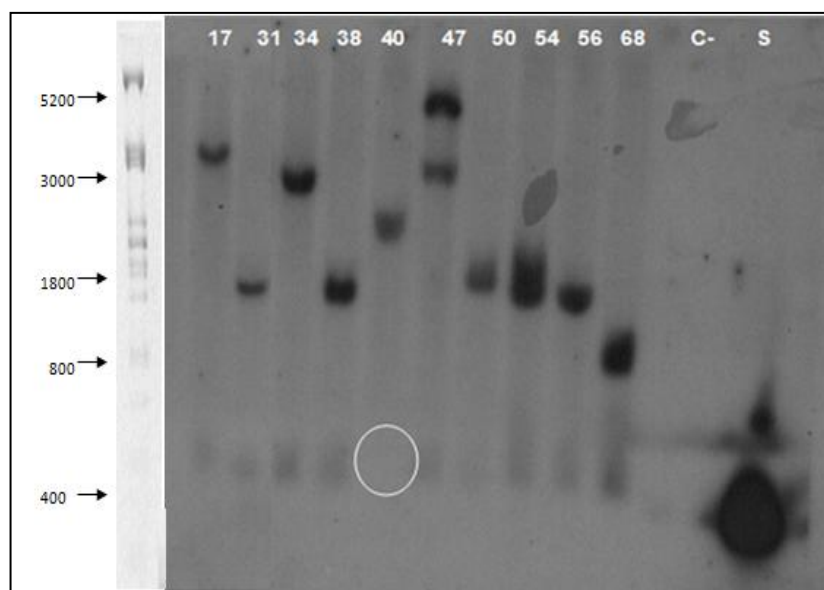
Se evaluaron los diez eventos: 17, 31, 34, 38, 40, 47, 50, 54, 56 y 68, siendo el control negativo, una planta no transformada, y el control positivo el plásmido pCIP35. Para este ensayo se realizó una digestión de 20 µg del ADN de cada evento con la enzima *EcoRI* y la sonda usada se obtuvo de la amplificación de la secuencia del gen de proteína de cubierta del virus PLRV que conforma el *hairpin*. Esta sonda de 400 pb fue marcada con fósforo radioactivo hibridándose en la secuencia sentido y antisentido del gen PC-PLRV. El patrón de bandas esperado fue de 400 pb y mayores a 819 pb (Fig. 13).



**Figura 13:** Sitios de corte de la enzima de restricción *EcoRI* en el ADN-T se indica en líneas punteadas (Vector NTI Advance® 9 software).

Entre los resultados se observó que el control negativo no presentaba banda, pero en el control positivo se pudo visualizar una banda de mayor intensidad de 400 pb correspondiente a la secuencia sentido de la proteína de cubierta, esta misma banda se detectó en la mayoría de los eventos evaluados (Fig.14).





**Figura 14: Análisis de *Southern blot* de los eventos transgénicos de papa.** Los eventos analizados fueron: 17, 31, 34, 38, 40, 47, 50, 54, 56, 68, con su control negativo, no transformado (C-) y la sonda(S) de 400 pb. El círculo en blanco en el evento 40 indica la falta de la secuencia sentido de la PC-PLRV del *hairpin*.

Por otro lado, el único evento que no presentó esta banda fue el evento 40 (Fig.14, círculo blanco). Respecto al número de copias del transgen el evento 47 presentó dos copias del ADN-T y los eventos restantes sólo una copia insertada (Tabla 1). Asimismo el tamaño de las bandas fluctuó entre 819 a 5200 bp, comparando este patrón entre los eventos se pudo observar que todos tenían diferente tamaño de banda, concluyendo que no son clones entre sí.

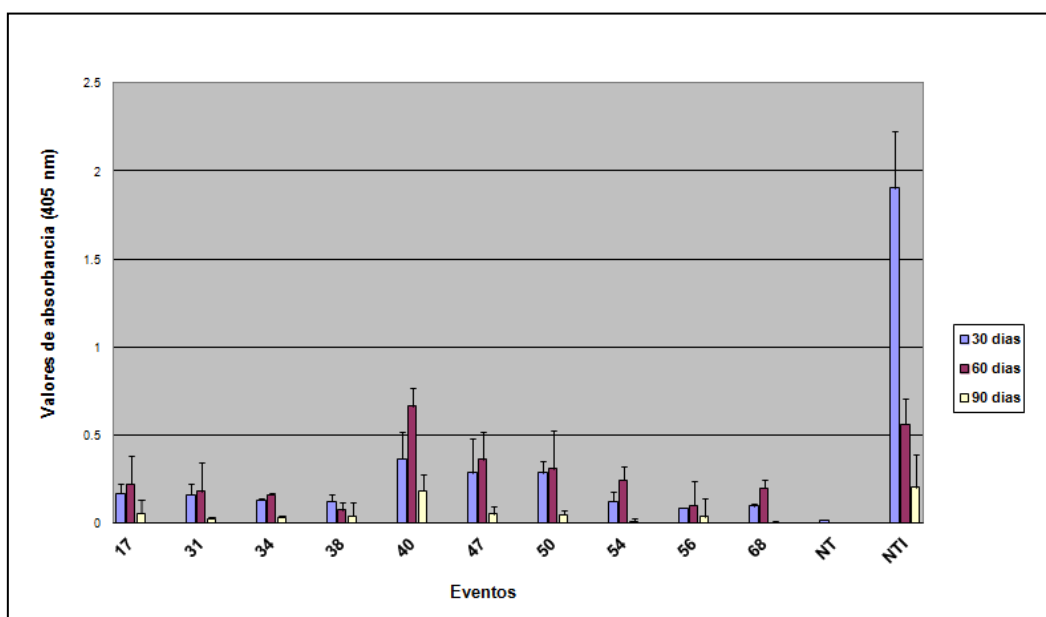
**Tabla 1.** Resumen del número de copias en lo diez eventos evaluados mediante *Southern Blot*

Evento	# Copias
17	1
31	1
34	1
38	1
40	1
47	2
50	1
54	1
56	1
68	1

## IV.2 Evaluación de la resistencia al virus PLRV

### IV.2. 1 Infección primaria

La prueba de DAS-ELISA indicó que los diez eventos en general presentaron valores de concentración viral reducida aproximadamente menos del 50% del control positivo, así también las evaluaciones durante los 60 dpi mostraron un aumento de estas concentraciones en todos los eventos y descendieron a los 90 dpi (recuperación), esto también se observó en los controles no transformados infectados (Fig.15).



**Figura 15: Infección primaria.** Promedio de valores de absorbancia por DAS-ELISA (405nm). Las evaluaciones fueron durante los 30, 60 y 90 dpi. Se indica la barra de error de desviación estándar. NT: no transformado no infectado, NTI: no transformado infectado con PLRV. Se consideró a los valores mayores o iguales a 0.05 como positivos.

Considerando la lectura de absorbancia obtenida, se registra cuatro eventos: 34, 54, 56 y 68, con valores bajos del virus a comparación de los restantes, pero siguieron siendo altos respecto al control no transformado no infectado (Tabla 2).

**Tabla 2.** Absorbancias de la infección primaria obtenidas por DAS-ELISA durante 30, 60 y 90 dpi. Los eventos 34, 54, 56 y 68 con sus valores de concentración viral correspondiente (rojo). Las medidas fueron restadas del valor obtenido de la planta no transformada no infectada (control negativo). Se consideró a los valores mayores o iguales a 0.05 como positivos

Eventos/dpi	30	60	90
17	0.167	0.220	0.052
31	0.160	0.178	0.023
34	0.129	0.159	0.032
38	0.122	0.074	0.038
40	0.362	0.664	0.183
47	0.284	0.361	0.050
50	0.284	0.307	0.047
54	0.120	0.244	0.004
56	0.082	0.098	0.033
68	0.096	0.199	0.000
NT	0.017	0.000	0.000
NTI	1.904	0.559	0.200

Por el contrario, los eventos 40, 47 y 50 presentaron valores altos de concentración viral (Tabla 2), así como el desarrollo de los síntomas característicos de la infección primaria, tales como enrollamiento de las hojas apicales y clorosis en la parte superior de la planta (Fig. 16).



**Figura 16: Síntomas de la infección primaria (60 dpi).** (A) evento 40, clorosis en hojas superiores, (B) evento 47, enrollamiento de hojas apicales, (C) evento 68 y (D) control no transformado no infectado, no presentaron síntomas.

#### IV.2. 2 Infección secundaria

Considerando que la manifestación de los síntomas de PLRV es más evidente durante la infección secundaria, logrando distinguir mejor los eventos resistentes de los susceptibles. Se pudo observar en este periodo que los eventos 34, 54, 56 y 68 mantuvieron valores bajos de virus (Tabla 3) y no se observaron síntomas de PLRV, siendo esta condición asignada con el valor numérico de 1. Por el contrario, los eventos 40 y 47 presentaron nuevamente la concentración elevada del virus y desarrollaron la enfermedad, a este estado se les asignó los valores de 2.4 y 2 respectivamente (síntomas severos) (Fig.17, 18 y 19).

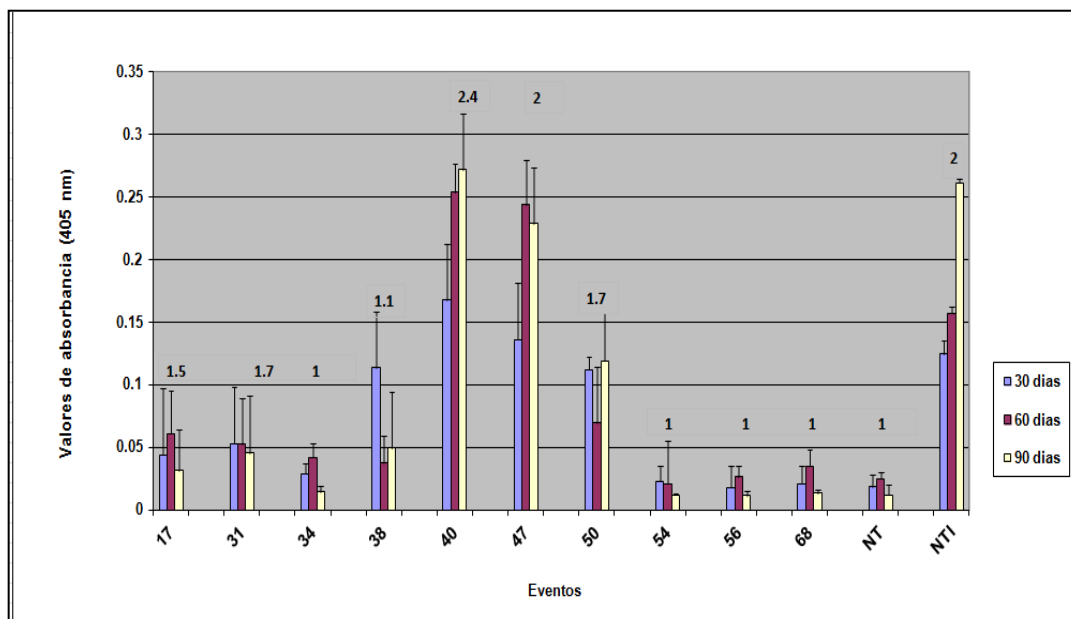


**Figura17: Síntomas de la infección secundaria (60 dpi).** (A) Control no transformado no infectado, (B) control no transformado infectado (NTI), (C) evento 56, (D) evento 47.



**Figura 18: Síntomas observados en las plantas durante la infección secundaria.** (A) Control no transformado infectado (NTI), (B) evento 40, (C) evento 56, (D) evento 68, (E) control no transformado no infectado.

Los valores asignados a la severidad de los síntomas como a su ausencia guardan una relación directa con las absorbancias obtenidas por DAS-ELISA, siendo los valores de 2 y 2.4 los más altos y 1 los más bajos (Tabla 3 y Fig. 19).



**Figura19: Cuantificación de PLRV mediante DAS-ELISA en la infección secundaria.** Promedio de valores de absorbancia a 405nm, durante 30, 60 y 90 días después de la siembra. Se indica los niveles de desviación estándar. NT: no transformado no infectado, y NTI: no transformado infectado con PLRV. Los valores asignados a la presencia de síntomas fueron: 1 (ausencia de síntomas), 2 (síntomas severos) y 3 (muerte de la planta). Se consideró a los valores mayores o iguales a 0.05 como positivos.

A su vez se observaron diferencias entre la concentración viral de la infección secundaria y la primaria, presentando esta última fluctuaciones de la respuesta de los eventos en las tres fechas de evaluación e incluso la disminución de la concentración viral a los 90 dpi, caso contrario ocurrió durante la infección secundaria, donde los eventos susceptibles manifestaron un incremento de la concentración viral a los 90 dpi, sin embargo los cuatro eventos: 34, 54, 56 y 68, mantuvieron estable su respuesta en todas las fechas (Tabla 3).

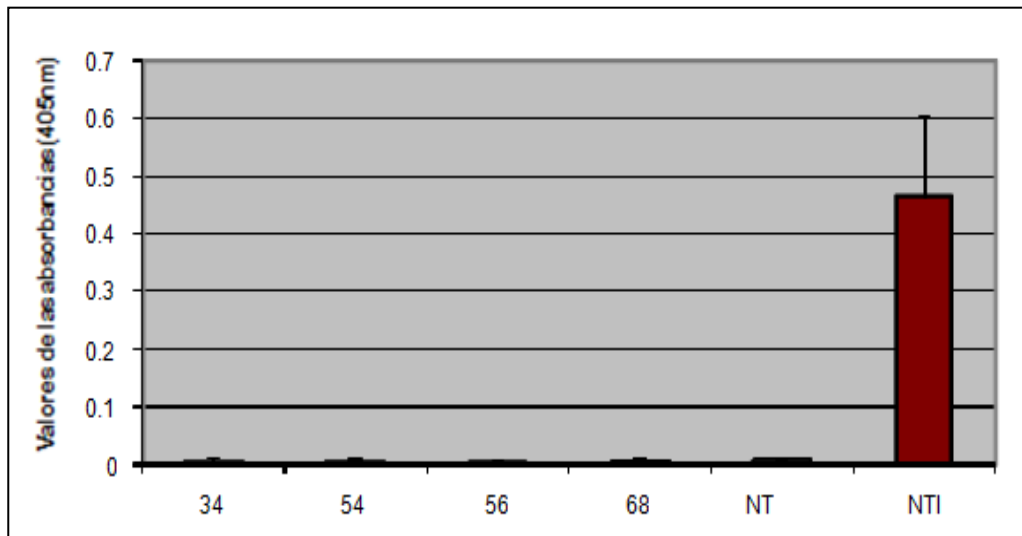
**Tabla 3.** Valores promedios de las lecturas de absorbancia obtenidas por DAS-ELISA durante la infección secundaria. En rojo los eventos 34, 54, 56 y 68. Las medidas ya están restadas del valor de la planta sana utilizada como control negativo (no transformado no infectado). Se considera valores positivos a los que sean mayores o iguales a 0.05

Eventos/días	30	60	90
17	0.044	0.061	0.032
31	0.053	0.053	0.045
34	0.029	0.042	0.014
38	0.113	0.038	0.049
40	0.167	0.254	0.271
47	0.136	0.244	0.229
50	0.112	0.069	0.119
54	0.023	0.021	0.012
56	0.018	0.026	0.012
68	0.021	0.035	0.013
NT	0.018	0.025	0.012
NTI	0.124	0.157	0.261

#### IV.2. 3 Infección terciaria

En este ensayo sólo se evaluaron los eventos: 34, 54, 56 y 68, evidenciándose la ausencia del virus al igual que el control no transformado no infectado (Fig.20).





**Figura 20: Cuantificación de PLRV en la infección terciaria mediante DAS-ELISA.** Promedio de valores de absorbancia a 405nm de los eventos: 34, 54, 56 y 68, las muestras fueron tomadas a los 60 días de siembra. Se indica la barra de error de desviación estándar. NT: no transformado no infectado y NTI: no transformado infectado con PLRV.

Las lecturas obtenidas luego de 2 meses de cultivar los eventos de muestra que la resistencia continúa en las siguientes generaciones (Tabla 4).

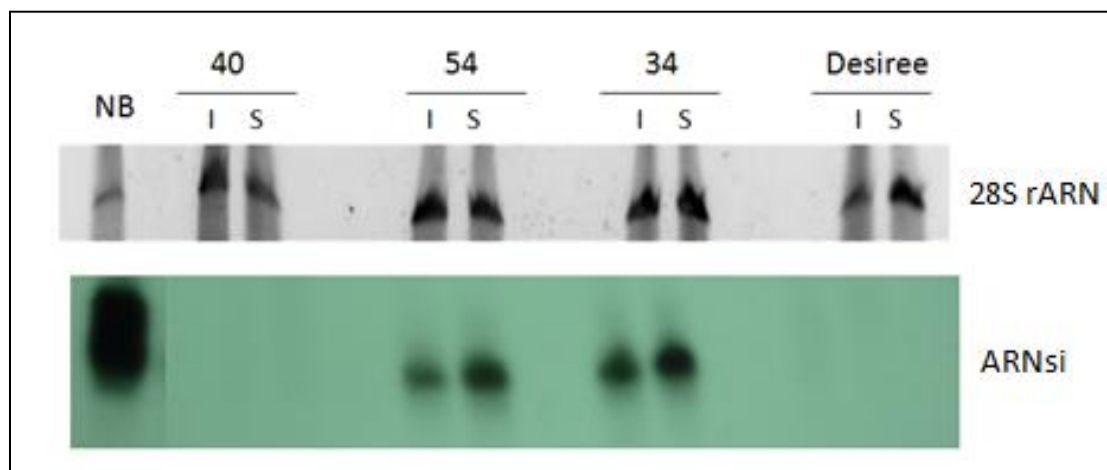
**Tabla 4.** Valores obtenidos por DAS-ELISA, infección terciaria. Los cuatro eventos registraron bajos valores de concentración viral. Los valores están restados del valor de la planta no transformada no infectada, utilizada como control negativo. Se considera valores positivos a los que sean mayores o iguales a 0.05

Eventos/ días	60
34	0.007
54	0.004
56	0.003
68	0.004
NT	0.007
NTI	0.465

### IV.3 Evaluación del mecanismo de ARNi por *Northern Blot*

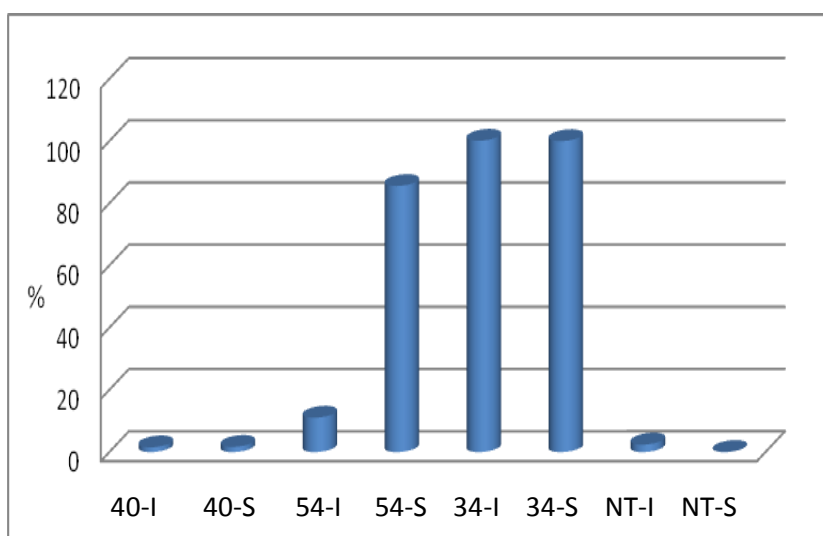
La introducción del mecanismo de ARNi en la planta de papa vía transgénesis, conllevó a la formación de pequeños fragmentos de 21-25 pb (ARNsi), productos de la degradación específica del ARN aberrante formado por la complementariedad entre la secuencia viral del transgen y el virus que infecta a la planta. La evidencia de esta respuesta fue posible por la detección de estos fragmentos con el ensayo de *Northern Blot*.

En la Fig.21 se muestra la detección de los ARNsi en los eventos 34 y 54, cuyos valores de concentración viral por DAS-ELISA fueron bajos.



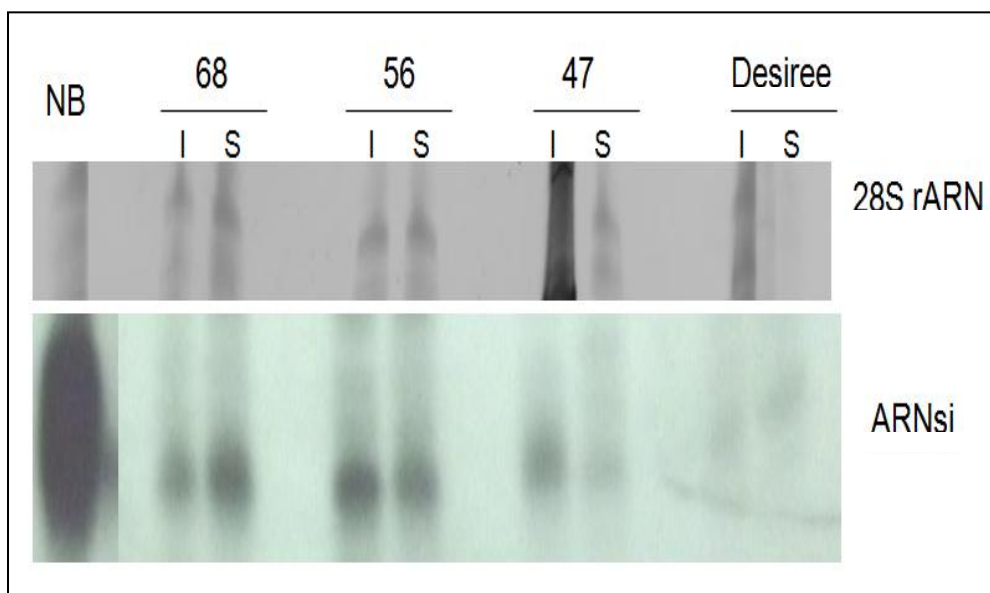
**Figura 21: Análisis de *Northern Blot*.** Detección de los ARNsi en los eventos 40,54 y 34. NB, *Nicotiana Benthamiana* , control positivo; Desiree, control negativo; I, planta infectada con PLRV; S, planta sana, no infectada con PLRV. En la parte superior se indica la carga de las muestras en el gel (28S rARN), y en la parte inferior los fragmentos de ARNsi (21-25 pb).

En el caso del evento 40 no se detectó los fragmentos de ARNsi (Fig. 21), esta respuesta se correlaciona con su concentración alta de virus obtenida por DAS-ELISA durante las tres generaciones.



**Figura 22: Densidad Relativa.** Cuantificación de la densidad de bandas (ARNsi, 21-25 pb) por el programa Image J (<http://imagej.nih.gov/ij>).

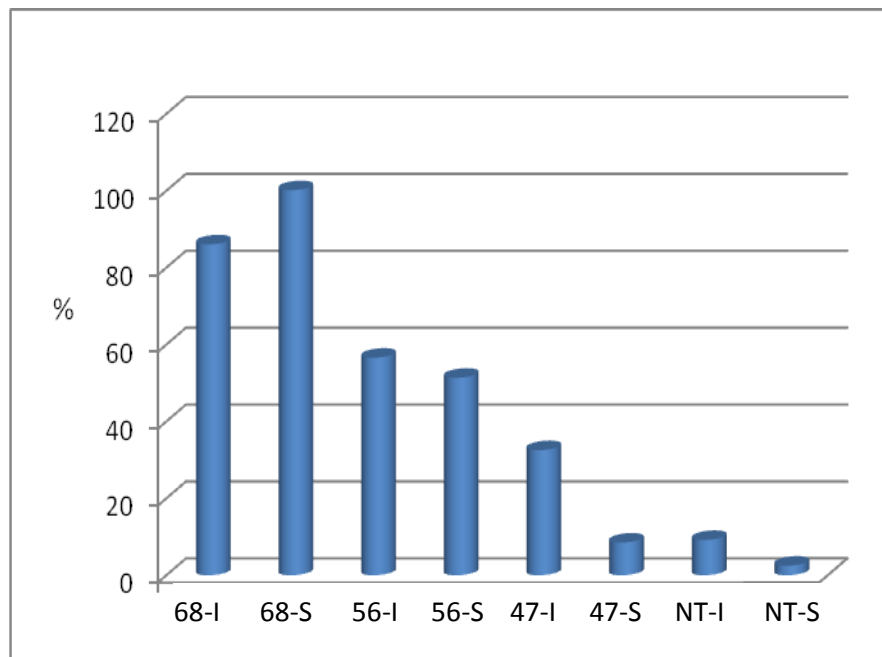
Respecto a la presencia de estos fragmentos en todos los eventos, tanto sanos como infectados, se observaron algunas variaciones entre las intensidades de las bandas. Utilizando el programa Imagen J se pudo normalizar estos resultados respecto a la relación de la densidad relativa entre la muestra cargada y de los valores obtenidos de ARNsi para cada evento (Fig. 22 y 24).



**Figura 23: Análisis de Northern Blot.** Detección de los ARNsi en los eventos 68, 56 y 47. NB, *Nicotiana Benthamiana*, control positivo; Desiree, control negativo; I, planta infectada con PLRV; S, planta sana, no infectada con PLRV. En la parte superior se indica la carga de las muestras en el gel (28S rARN), y en la parte inferior los fragmentos de ARNsi (21-25 pb).

Por otro lado, no todas las muestras presentaron la misma carga homogénea de concentración de ARNsi, tal es el caso del evento 47-I (Fig. 23), y el cual presentó una mayor concentración de muestra a comparación del mismo evento pero sano. Por ello los valores de concentración de ARNsi reportaron porcentajes altos ya que el exceso de la muestra incrementó la densidad relativa de los pequeños fragmentos, a comparación del

mismo evento pero en su estado no infectado, presentando una concentración baja de ARNsi, debido a que carga de la muestra fue menor que la del evento infectado (Fig. 24).



**Figura 24: Densidad Relativa.** Cuantificación de la densidad de bandas (ARNsi, 21-25 pb) por el programa Image J (<http://imagej.nih.gov/ij>).

En los eventos 34, 56 y 68 se pudo observar una expresión basal del mecanismo de ARNi con la producción de los ARNsi antes y después de su infección, por el contrario en el evento 54 se tuvo una relación inversa de la expresión (Fig. 22 y 24).

## V. DISCUSIÓN

### V.1 Análisis por *Southern Blot* de la incorporación del transgen

Esta técnica permite localizar secuencias específicas dentro del genoma, con el uso de enzimas de restricción y sondas de ADN que reconozcan el ADN-T insertado, usándose en este caso como sonda el fragmento del gen PC-PLRV de 400 pb, y la enzima de restricción *EcoRI* que corta dentro del ADN-T y en otros puntos de restricción del genoma vegetal (Fig. 13).

Se determinó que la integración del ADN-T en la célula huésped era aleatoria, pues el patrón de bandas registrado contaba con diferentes bandas (Fig.14), esto demostró que las plantas provenían de diferentes callos y por lo tanto eran eventos independientes (Kreuze, 2002). Del mismo modo se registró entre una a dos copias del transgen (Tabla 1). Cabe resaltar que lo ideal es obtener una sola copia en las líneas transgénicas, ya que a más copias se podría inactivar genes esenciales para la planta (Srivastava *et al.*, 1999; Nigel *et al.*, 2002).

La obtención de eventos con bajo número de copias insertadas es una característica de la transformación por *A. tumefaciens* en comparación con la técnica de bombardeo de partículas (Gelvin, 2000; Zhao *et al.*, 2001). Esta última puede introducir más de diez copias del transgen (Kanevski *et al.*, 1992). Haciendo que la expresión del transgen sea muy alta o resulte en alguna modificación postraducciona que llegue a silenciar al transgen (Muskens *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2007).

Por otro lado en la Fig.14 se registró una banda de 400 pb que correspondía al segmento sentido de la secuencia génica de PC-PLRV, asimismo se observaron bandas mayores de 819 pb en todos los eventos excepto el evento 68 que presentó una banda menor a este tamaño, en este caso aparentemente se habría insertado el ADN-T hasta un segmento antes o en el inicio de la secuencia del borde derecho (RB) del transgen,

esto es posible ya que este flanco es el primer extremo en ser escindido para el traslado del ADN-T (Gelvin, 2000).

De mismo modo, no se observó en el evento 40 la banda de 400 pb del segmento *sense* del gen de la PC -PLRV que conforma el *hairpin* (Fig.14, círculo blanco). En consecuencia no se habría formado el ARNdc aberrante que actúa como desencadenante del mecanismo ARNi para producir los fragmento de ARNsi y conferir resistencia al virus de PLRV (Wesley *et al.*, 2001). Esto conllevó a una respuesta susceptible en el evento 40, lo cual se verificó con los resultados obtenidos en las pruebas de DAS-ELISA y el desarrollo de los síntomas de la enfermedad siendo considerado este evento como susceptible.

## **V.2 Respuesta de resistencia a PLRV por ARNi**

La evaluación por DAS-ELISA determinó que los eventos: 34, 54, 56 y 68, presentaron el menor valor de concentración viral de PLRV, siendo iguales al control sano no infectado. Las infecciones fueron realizadas con injertos de *Flor blanca* como fuente de PLRV, y se considera a este tipo de infección como el método más efectivo y potente de infección viral a comparación de otros (Palucha *et al.*, 1998). Por otro lado la obtención de 40% de plantas resistentes a PLRV por esta vía es un claro ejemplo de que el mecanismo de ARNi estaría funcionando tal como reportaran Smith *et al.*, (2000) quienes obtuvieron el 100% de eficiencia del mecanismo de ARNi empleando una construcción tipo hpARN.

La evaluación fue durante la infección primaria, secundaria y terciaria (Fig. 15, 19 y 20), observándose plantas con un desarrollo normal y asintomático para estos eventos (Fig.16, 17 y 18). Esto es debido a la escasez del ARN viral, y por ende la ausencia de partículas virales que hacen de las plantas fuentes pobres de virus. Del mismo modo se detectaron los eventos susceptibles, 40, 47 y 50, que se comportaron como el control positivo para el virus de PLRV, presentando concentraciones altas del

virus además del desarrollo de los síntomas de la enfermedad (Tabla 2 y 3). Resultados similares fueron obtenidos por Kalantidis *et al.*, (2002), quienes usaron el mecanismo de ARNi para el virus CMV, logrando obtener eventos transformados con niveles de resistencia variables, y una alta proporción de ellos fueron resistentes o inmunes al virus. Otros trabajos reportan eventos resistentes y susceptibles a PLRV a partir de secuencias *sense* o *antisense* del gen de la replicasa viral (Derrick y Barker, 1997; Barker *et al.*, 2001; Savenkov *et al.*, 2001), Vazquez *et al.*, 2001; Ehrenfeld *et al.*, 2004), también en PVY a partir del gen de PC o genes virales que codifican para la proteasa del virus, y en TMV con la proteína de movimiento del virus (Hu *et al.*, 2011).

Por otro lado Wang (2000) reportó que sólo una copia del hpARN es suficiente para inducir inmunidad a la infección viral pues los transgenes virales convencionales (de un solo sentido o que expresen una proteína) usualmente producen una parcial y algunas veces inestable resistencia, la cual a menudo depende de múltiples copias del transgen.

Esta respuesta la evidenciamos en los eventos resistentes obtenidos a partir del mecanismo de ARNi, la cual puede ser definida como un tipo de resistencia al establecimiento de la infección inicial, o resistencia a la dispersión viral de células infectadas desde un inicio, pues los tubérculos provenientes de plantas que habían sido infectadas con el virus previamente, infección primaria, fueron sembradas y evaluadas durante la infección secundaria y terciaria preservando su resistencia (Fig. 19 y 20).

Se pudo determinar que la resistencia registrada en estos eventos está relacionada con el mecanismo de ARNi. Siendo los fragmentos de ARNsi producidos a partir de la construcción tipo *hairpin*, detectados por el ensayo de *Northern Blot*, evidenciando que este mecanismo está activo (Kalantidis *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Bucher *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2011).

Mediante los ensayos de DAS-ELISA se observó que los eventos susceptibles: 40, 47 y 50 no presentaron ningún grado de resistencia, y por *Northern Blot* los eventos



40 y 47 no evidenciaron acumulación de ARNsi. Por otro lado, los eventos resistentes: 34, 54, 56 y 68, presentaron baja concentración viral y alta acumulación de ARNsi, asimismo se obtuvieron eventos con una concentración intermedia de virus: 17, 31 y 38.

Al parecer estas respuestas de resistencia se deban a múltiples factores que afectan el mecanismo de ARNi, como los siguientes:

1. La incorrecta complementación entre la secuencia *sense* y *antisense* del *hairpin* para la producción del ARN aberrante impediría la producción de los ARNsi. Éstos son marcadores importantes del mecanismo de ARNi (Gaba *et al.*, 2010). De acuerdo a los resultados de *Southern Blot* el evento 40 no presentó la secuencia sentido del gen de PC-PLRV del *hairpin*, en consecuencia no se produjeron los ARNsi, evidenciando la susceptibilidad a la infección del virus como si fuera un evento no transformado infectado (Fig. 14 y 22).
2. Una explicación de la fluctuación en la respuesta de resistencia sería que el mecanismo de ARNi puede ser muy susceptible a pequeños cambios como la especificidad en el reconocimiento entre la secuencia viral y el transgen en sí. Considerando que la secuencia nucleotídica viral que contenga >10% de divergencia con respecto a la secuencia del transgen es catalogada como insensible a esta forma de resistencia, y asignada como otra especie (Prins, 2003). En nuestro caso los eventos que presentaron un nivel intermedio de acumulación viral comparado con los eventos restantes, es posible que tengan una alteración en la estructura del plegamiento entre el transgen y el *hairpin*, quizás afectado por modificaciones postraduccionales, como la integración del transgen en una zona de la heterocromatina pobre en expresión génica, o la diferencia en el nivel de ploidía de la especie vegetal transformada como *Solanum tuberosum* (Chen *et al.*, 2004; Missiou *et al.*, 2004). Otra causa

posible es que los ribosomas de los eventos susceptibles lleguen a reconocer alguna parte del ARN que se esté transcribiendo evitando la formación de un adecuado plegamiento del ARN para formar el ARN<sub>dc</sub>, y por lo tanto, se suprima el reconocimiento de la enzima *Dicer* inhibiéndose la producción de los ARN<sub>si</sub> (Bucher *et al.*; 2006).

3. Es posible que no haya un efectivo reconocimiento de los ARN<sub>si</sub> al ARN<sub>m</sub> del virus, debido a efectos de posición a lo largo de su blanco, mostrando una limitada eficiencia, o quizás por alguna formación secundaria durante el proceso (Overhoff *et al.*, 2004).
4. Por otro lado no se evidenció una relación entre el número de copias del transgen (Tabla 1) y la acumulación de los ARN<sub>si</sub> (Fig. 22 y 24). Tal es el caso de los eventos; 47 (dos copias) y 40 (una copia), que presentaron una diferencia de una copia entre los dos, y no lograron producir niveles considerables de ARN<sub>si</sub>, siendo reportados como eventos susceptibles a la infección del virus. Esto demuestra que no hay una relación entre el número de copias y la resistencia o susceptibilidad que puedan presentar los eventos. A su vez hasta la fecha no hay una conclusión general que explique si una segunda copia extra del transgen pueda incrementar la resistencia viral; estas observaciones también se han presentado en otros cultivos como: tomate, cereales, tabaco (Hu *et al.*, 2011).
5. En el análisis de DR se observaron diferencias en la producción de ARN<sub>si</sub> de los eventos susceptibles: 40 y 47 así como de los resistentes: 34, 54, 56 y 68, antes y después de la infección viral (Fig. 22 y 24). En el evento susceptible 40, en su estado sano e infectado se registró el 2% de la producción de ARN<sub>si</sub>, estos valores fueron iguales al control NT-I (2%), siendo para el NT-S el 0%. Este comportamiento era de esperarse pues por *Southern Blot* se evidenció

que este evento no tenía completo el *hairpin* impidiendo la formación del ARNdc.

6. El evento 47 presentó un valor de DR en su estado sano e infectado del 9 y 33% respectivamente, y el control NT-I el 9% (Fig. 24). Asimismo en la parte superior correspondiente al segmento 28S rARN de la Fig. 23, se observa en el evento 47-I una diferencia de concentración de la muestra cargada respecto a los demás eventos. A pesar de que se cargó más muestra de lo estipulado, el 33% de DR de los ARNsi para este evento no fue lo suficiente para evitar que la infección viral se propague, además que este evento sin infección presentó un nivel de expresión basal del 9% de DR igual que el control NT-I. Se puede inferir que el mecanismo de ARNi no estuvo activo antes de la infección, y en consecuencia la producción de los ARNsi fue baja e insuficiente para controlar la propagación viral.
7. La DR de los eventos 54-S y 54-I registró el 86% y 11% de la producción de ARNsi comparado con el 2% del control NT-I. Las posibles razones para explicar esta variabilidad no son claras. Sin embargo una posible justificación es que el clivaje del ARNdc fue rápido y continuo, y los productos de ARNsi se usaron de manera constante en el ciclo de retroalimentación del mecanismo de ARNi, tal como se demuestra en la Figura 2. En consecuencia la acumulación de estos pequeños fragmentos se registró en menor cantidad debido a su constante e inmediato uso contra la infección viral. Por otro lado se registraron valores altos de DR en los eventos: 34-S (100%), 34-I (100%), 56-S (51%), 56-I (57%), 68-S (100%) y 68-I (86%), por el contrario los controles NT-S, y NT-I presentaron el 0% y 2% respectivamente (Fig. 22 y 24). El adecuado funcionamiento del mecanismo de ARNi y la constante producción de los

ARNsi en estos eventos, mantuvieron una defensa activa en el estado sano de la planta frente una infección viral.

8. A pesar de haberse mantenido controlado los factores abióticos en el invernadero de bioseguridad es posible que alguna alteración en las condiciones medioambientales como; temperatura, porcentaje de humedad, luz, mecanismo de transmisión, tiempo de adquisición e inoculación del virus, el estado o la edad de la planta, afecten de alguna forma el funcionamiento del mecanismo de ARNi. Trabajos realizados por Szittya *et al.*, (2003) demostraron que un fenotipo resistente a un virus por ARNi, tras ser expuesto a un ambiente con la temperatura de 15°C pierde esta resistencia. Adicionalmente, Kalantidis *et al.*, (2002), Nikan y Barker, (2008) resaltaron que las variaciones observadas en los factores abióticos afectan el funcionamiento de este mecanismo, así como el desarrollo de las plantas transgénicas para su uso en el campo donde se busca evaluar la resistencia en un ambiente más real. También se indicó que a mayor temperatura hay una mejor producción de los ARNsi.

Quizás se pueda también atribuir esta respuesta a los eventos con mediana resistencia que se obtuvieron en los ensayos (17, 31 y 38), aunque no se realizaron estudios que abordaran estos análisis es posible que existieran estas fluctuaciones en algún momento del desarrollo de las plantas y sea una causa probable del ineficiente funcionamiento del mecanismo de ARNi en estos eventos.

9. Otra posible causa que pueda explicar la variación en la respuesta de resistencia viral, son las regulaciones transcripcionales del ADN-T en el genoma de la planta, en las cuales la región del promotor o la región transcrita del transgen (en nuestro caso el *hairpin*) puede ser metilada, esto se conoce como silenciamiento transcripcional, y puede afectar la resistencia viral

conferida por el mecanismo de ARNi (Tougou *et al.*, 2007; Mlotshwa *et al.*, 2010).

10. En contraparte existen reportes que indican que las regiones metiladas de ADN pueden llevar a la alteración local de la estructura de la cromatina y a una prematura terminación de la transcripción produciendo un ARNdc el cual actuaría como molde para la enzima RdRp, codificada por la planta, produciendo ARNsi y la resistencia viral. Por lo tanto la metilación del transgen y la producción de ARN aberrante jugarían un rol importante en el mecanismo de ARNi (Sonoda y Nishiguchi, 2000).

Del mismo modo los resultados obtenidos en el presente trabajo son similares a los de Arif *et al.*, (2011), donde también demuestra la eficiencia del mecanismo de ARNi, usando el constructo tipo *hairpin*, en la resistencia de manera simultánea a tres virus de papa PLRV, PVX y PVY. Aunque el resultado serológico sólo comprendió la evaluación de la infección primaria (60 dpi), se identificó tres eventos resistentes (dos con dos copias del transgen y uno con una copia), logrando detectar por *Northern Blot* los ARNsi en estos eventos resistentes.

La presente tesis no sólo abarcó las evaluaciones de la infección primaria, adicionalmente evaluó la infección secundaria y terciaria de los eventos resistentes, demostrando que su resistencia se mantuvo, y aunque no se hizo una evaluación por *Northern Blot* durante la infección terciaria, es probable que el mecanismo de ARNi también se mantenga activo con valores altos y constantes de ARNsi. Trabajos como Kalantidis *et al.*, (2002) respaldan este comportamiento, debido al registro de concentraciones altas de los ARNsi al cabo de los 30 dpi, manteniéndose constantes durante el desarrollo de la planta (dos meses), y Hu *et al.*, (2011), quienes detectaron en plantas de tabaco pocos cambios en la acumulación y composición de los ARNsi al cabo de uno o tres meses después de la inoculación viral de TMV y CMV.

El incorporar dentro del genoma de la planta un transgen sin producir algún cambio intrínseco en sus características fenotípicas, es difícil de conseguir con el mejoramiento convencional, más aún si se trabaja con plantas que son difíciles de mejorar por esta vía debido a la incompatibilidad genética o a la vinculación con rasgos indeseados. Ante lo expuesto podemos considerar que la transformación genética es una alternativa para obtener plantas que contengan alguna característica deseable e importante como es la resistencia a enfermedades de tipo viral o de otra índole.

En tal sentido, se ha demostrado que el constructo *hairpin* es efectivo para incrementar la eficiencia del mecanismo de ARNi en la producción de los ARNsi, obteniéndose un cultivo resistente a diversos virus. Sin la codificación de un polipéptido viral, esta planta podría ser considerada libre de antígenos virales pues no habría heteroencapsidación, un fenómeno en el cual se puede propagar la versión inesperada del patógeno (Palucha *et al.*, 1998; Bucher *et al.*, 2006). Asimismo se evitaría la acumulación de ARNm, y considerando la bioseguridad sería mínimo el riesgo de recombinación, transcapsidación, sinergismo o complementación en las plantas que contengan este tipo de mecanismo de resistencia (Xu *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2011).

## **VI. CONCLUSIONES**

1. Los eventos transgénicos resistentes obtenidos evidenciaron una alta producción de ARNsi (antes y después de la infección), en comparación de los eventos susceptibles que presentaron una producción nula o baja de ARNsi, así como los controles no transformados.
2. Se confirmó que la resistencia a PLRV en los eventos transformados se debió a la acción del mecanismo de ARNi.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel, P.; Nelson, R.; Hoffmann, N.; Rogers, S.; Fraley, R.; Beachy, R. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232 (4751):738-43.
- Agrawal, N.; Dasaradhi, P.; Mohmmmed, Asif.; Malhotra, Pawan.; Bhatnagar, R and Mukherjee S. 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology* 67: 657–685.
- Arif, M.; Arshad, M.; Zafar, S.; Mansoor, S. 2011. Engineering broad-spectrum resistance against RNA viruses in potato. *Transgenic Res.* 21(2):303-11.
- Ashoub, A. 2003. Full-length sequence of egyptian Potato leafroll virus (PLRV) isolate. *Arab J. Biotech* 6 (2):173-182.
- Bai, Y.; Guo, Z.; Wang, X.; Dongi, B.; Zhang, W. 2009. Generation of double-virus-resistant marker-free transgenic potato plants. *Progress in Natural Science* 19 (5): 543-548.
- Barker, H.; Webster, K.; Jolly, C.; Reavy, B.; Kumar, A.; Mayo, M. 1994. Enhancement of resistance to potato leafroll virus multiplication in potato by combining the effects of host genes and transgenes. *Mol Plant Microbe Interact* 7(4):528-30.
- Barker, H.; Reavy, B.; Mc Geachy, K.; Dawson, S. 1998. Transformation of *Nicotiana benthamiana* with the potato mop-top virus coat protein gene produces a novel resistance phenotype mediated by the coat protein. *Molecular Plant- Microbe Interact* 11(7): 626–633.
- Barker, H.; Waterhouse, P. 1999. The development of resistance to luteoviruses mediated by host genes and pathogen-derived transgenes. *The Luteoviridae* 169-210.



- Barker, H.; McGeachy, H.; Ryabov, E.; Commandeur, U.; Mayo, M.; Taliansky, M. 2001. Evidence for RNA-mediated defence effects on the accumulation of *Potato leafroll virus*. *Journal of General Virology*, 82 (12):3099–3106.
- Batool, A.; Aslam Khan, M.; Farooq, J.; Mughal, M. 2011. Elisa-based screening of potato germplasm against potato leaf roll virus. *J. Agric. Res* 49(1): 57-63.
- Brandolini, A.; Caligari, P. D. S; Mendoza, H. A. 1992. Combining resistance to potato leafroll virus (PLRV) with immunity to potato viruses X and Y (PVX and PVY). *Euphytica* 61(1):37-42.
- Brault, V.; Pfeffer, S.; Erdinger, M.; Mutterer, J and Ziegler-Graff, V. 2002. Virus-Induced Gene Silencing in Transgenic Plants Expressin the Minor Capsid Protein of Beet western yellows virus. *MPMI* 15 (8): 799–807.
- Beachy, R. 1999. Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:659-64.
- Bernaola, L. 2008. Caracterización molecular de la resistencia al tizón tardío en *Solanum paucissectum* Ochoa (*Solanaceae*) mediante el uso de la técnica NBS y marcadores para loci candidatos). Tesis para título profesional de Biólogo. UNMSM, Lima –Perú, 118 p.
- Bernstein, E.; Caudy, A.; Hammond, S.; Hannon, G. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-6
- Büchen-Osmond, C. 2002 Potato Leafroll Virus. ICTVdb Virus descriptions. <http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/ICTVdb/39010012.htm>.
- Bucher, E.; Lohuis, D.; Poppel, P.; Geerts, C; Goldbach, R.; Prins, M. 2006. Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. *Journal of General Virology* 87: 3697–3701.
- Burgos, G. 2006. Contribución de la papa en la alimentación de niños entre 6 y 36 meses de edad y de sus madres en comunidades rurales de Huancavelica. Tesis para título profesional de Biólogo, UNALM, Lima –Perú, 128 p.

- Cabrera, A. 2007. Caracterización de un grupo de *Solanum* sección Petota silvestres para resistencia al virus del enrollamiento de la hoja de la Papa (PLRV). Tesis para título profesional de Biólogo. UNALM, Lima –Perú, 110 p.
- Callaway, D.; Giesman-Cookmeyer, E.; Gillock, T.; Sit, T and Lommel, S. 2001. The multifunctional Capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu. Rev. Phytopathol* 39:419–460.
- Cañedo, V. 1997. Fascículo 3.8. Afidios vectores de virus importantes en la producción de tuberculos-semillas: identificación y estudio de poblaciones. Fasc. 3.8 – 97. Centro internacional de la papa (CIP).
- Chen, X. 2007. A marked end. *Nature Structural & Molecular Biology* 14: 259–260.
- Chen, Y.; Lohuis, D.; Goldbach, R.; Prins, M. 2004. High frequency induction of RNA-mediated resistance against Cucumber mosaic virus using inverted repeat constructs. *Molecular Breeding* 14: 215–226.
- Christensen, N.W. 1996. A new hypothesis to explain phosphorus-induced zinc deficiencies. Ph.D. Dissertation. Oregon State University, Corvallis, 130p.
- CIP, 2007. Centro Internacional de la Papa. <http://www.cipotato.org/potato/>
- Cogoni, C., Irelan, J. T., Schumacher, M., Schmidhauser, T., Selker, E. U., and Macino, G. 1996. Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J.* 15,3153–3163.
- Cordero, M. 2008. El virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV). Rev. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 12: 37-49.
- Cuzzo, M.; O'connell, K.; Kanieswski, W.; Fang, R.; Chua, N.; Tumer, N. 1988. Viral protection in transgenic plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* 6: 549-557.
- Davidson, T. M. W. 1973. Assessing resistance to leafroll in potato seedlings. *Potato Res* 16: 99-108.

- Derrick, P and Barker, H. 1997. Short and long distance spread of potato leafroll luteovirus: effects of host genes and transgenes conferring resistance to virus accumulation in potato. *Journal of General Virology* 78: 243–251.
- Ehrenfeld, N.; Romano, E.; Serrano, C.; Arce-Johnson, P. 2004. Replicase mediated resistance against Potato Leafroll Virus in potato Desirée plants. *Biol Res* 37: 71-82.
- Elbashir, S.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15(2): 188-200
- Estrada, N. 2000. La Biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. CIP-IPGRI-PRACIPA-IBTA-PROINPA-CASUDE-CID, 159- 179.
- FAO. 2008. Food and Agriculture organization of the United Nations. <http://www.fao.org/>
- FAOSTAS, 2008. <http://faostat.fao.org/default.aspx>
- Fernández, V. 1995. Los Virus Patógenos de las plantas y su control. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Buenos Aires (Argentina). 4ta Edición.
- Fire A. 1999. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15:358–363.
- Fraley, R.; Rogers, S.; Horsh, R.; Sanders, P.; Flinck, J.; Adams, S.; Bittner, M.; Brand, L.; Fink, C.; Fry, J.; Gallup, G.; Golberg, S.; Hoffmann, N.; Woo, S. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci* 80: 4803-4810.
- Franco-Lara, L.; McGeachy, K.; Commandeur, U.; Martin, R.; Mayo, M.; Barker H. 1999. Transformation of tobacco and potato with cDNA encoding the full-length genome of potato leafroll virus: evidence for a novel virus distribution and host effects on virus multiplication. *J Gen Virol* 80(11): 2813-2822.
- Fribourg, C. 1995. Sintomatología y su relación con las alteraciones morfológicas y fisiológicas en plantas atacadas por virus fitopatógenos. Centro Internacional de la Papa, *Fitopatología* (Perú). 30(2): 66-73 p,

- Gaba, V.; Rosner, A.; Maslennin, L.; Leibman, D.; Singer, S.; Kukurt, E.; Shibolet, Y.; Gal-On, J. 2010. Hairpin-based virus resistance depends on the sequence similarity between challenge virus and discrete, highly accumulating siRNA species. *Eur J Plant Pathol* 128:153–164.
- Graham, M.W.; Craigs, S.; Waterhouse, P.M. 1997. Expression patterns of vascular-specific promoter RolC and Sh in transgenic potatoes and their use in engineering PLRV-resistant plants. *Plant Mol Biol* 33(4):729-735.
- Gelvin, S. 2000. Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 51: 223-256.
- Gonsalves, D. 1998. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annu Rev Phytopathol* 36:415-37.
- Gray, S and Gildow F. 2003. Luteovirus-aphid interactions Annual Review of Phytopathology. 41: 539-566.
- Guyader, S and Danie' le GIBLOT Ducray. 2002. Sequence analysis of Potato leafroll virus isolates reveals genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between overlapping reading frame products. *Journal of General Virology* 83:1799–1807.
- Hamester, W.; Hils, U. 2003. World catalogue of potato varieties. Agrimedia, Bergen/Dumme.
- Hamilton, A.; Baulcombe, D. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286(5441): 950-2.
- Hawkes, J. 1990. The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Belhaven Press, London. 135-160.

- Hemenway, C.; Fang, R.; Kaniewski, W.; Chua, N & Tumer, N. 1988. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J* 7: 1273–1280.
- Horton, D and Anderson, J.1992. Potato production in the context of the world and farm economy. In: P.M. Harris ed. *The Potato Crop: The Scientific Basis for Improvement*. Chapman and Hall. 909p.
- Hu, Q.; Niu,Y.; Zhang, K.; Liu, Y.; Zhou, X. 2011. Virus-derived transgenes expressing hairpin RNA give immunity to Tobacco mosaic virus and Cucumber mosaic virus. *Virology Journal* 8(41): 1-11.
- INEI, 2004. <http://www.inei.gob.pe/>
- Kalantidis, K.; Psaradakis, S.; Tabler, M.; Tsagris, M. 2002. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *MPMI* 15(8):826–833.
- Kanevski, I; Thakur, S; Cosowsky, L; Sunter, G; Brough, C; Bisaro, D; Maliga, P. 1992. Tobacco lines with high copy number of replicating recombinant geminivirus vectors after biolistic DNA delivery. *The Plant Journal* 2(4): 457-463.
- Kaniewski, W.; Lawson, C.; Sammons, B.; Haley, L.; M, Hart, J.; Delannay, X.; Tumer N. 1990. Field resistance of transgenic Russet Burbank potato to effects of infection by potato virus X and potato virus Y. *Nature Biotechnology* 8:750–754.
- Kaplan,I; Lee, L; Ripoll. D; Palukaitis, P; Gildow, F and Gray,S. 2007. Point mutations in the potato leafroll virus major capsid protein alter virion stability and aphid transmission. *Journal of General Virology* 88, 1821–1830.
- Kawchuk, L.; Martin, R.; Mcpherson, J. 1990. Resistance in Transgenic potato expressing the potato leafroll virus coat protein gene. *Mol Plant Microbe Interactions* 3:301-307.

- Kreuze, J. 2002. Molecular studies on the sweetpotato virus disease and its two causal agents. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala- Sweden, 63p.
- Kreuze, J.; Savenkov, E.; Cuellar, W.; Li, X.; Valkonen, J. 2005. Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *J. Virol* 79:7227–7238.
- Lennefors ,B.; Savenkov, E.; Bensefelt, J.; Wremerth,W.; van Roggen, P.; Tuveesson, S.; Valkonen, J.; Gielen, J. 2006. dsRNA-mediated resistance to Beet necrotic yellow vein virus infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. vulgaris). *Mol Breed* 18:313-325.
- Lindbo, J.A., and Dougherty, W.G. 1992. Pathogen-derived resistance to a potyvirus: Immune and resistance phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Mol. Plant-Microbe Interact* 5, 144-153.
- Loebenstein, G.; Brunt P.; Lawson, R. 2001. Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes. Dordrecht (Netherlands). 460 p.
- Loesch-Fries, L.; Merlo, D.; Zinnen, T.; Burhop, L.; Hill, K.; Krahn, K.; Jarvis, N.; Nelson, S.; Halk E. 1987. Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO J* 6(7):1845-1851.
- MacKenzie, DJ.; Tremaine, JH. 1990. Transgenic *Nicotiana debneyii* expressing viral coat protein are resistant to potato virus S infection. *J Gen Virol* 71 (9): 2167-2170.
- Martin, R.; Keese P.; Young, M.; Waterhouse, P.; Gerlach, W. 1990. Evolution and molecular biology of luteoviruses. *Annual Review Phytopathology* 28: 341-363.
- Mayo, M.; Ryabov, E.; Fraser, G and Taliansky, M. 2000. Mechanical transmission of Potato leafroll virus. *Journal of General Virology* 81: 2791–2795.
- Medrano, G; Reidy, M; Liu, J; Ayala, J; Dolan, M; and Cramer, C. 2008. Rapid system for evaluating bioproduction capacity of complex pharmaceutical proteins in plants. *Methods in Molecular Biology* 483: 51–67.

- MINAG, Ministerio de Agricultura del Perú. 2008. <http://www.minag.gob.pe/cultivos-de-importancia-nacional/papa.html>.
- Missiou, A.; Kalantidis, K.; Boutla, A.; Tzortzakaki, S.; Tabler, M.; Tsagris, M. 2004. Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. *Mol Breed* 14:185-197.
- Mlotshwa, S.; Voinnet, O.; Florian, M.; Matzke, M.; Vaucheret, H.; Wei, S.; Pruss, G.; Vance, V. 2002. RNA Silencing and the Mobile Silencing Signal. *The Plant Cell* 14: 289-301.
- Mlotshwa, S.; Pruss, G.; Gao, Z.; Mgunshini, N.; Li, J.; Chen, X.; Bowman, L.; Vance, V. 2010. Transcriptional silencing induced by Arabidopsis T-DNA mutants is associated with 35S promoter siRNAs and requires genes involved in siRNA-mediated chromatin silencing. *The Plant Journal* 64: 699–704.
- Mukarami, M. 2003. Studies of tomato spotted wilt virus in Peanut transgenic and Arabidopsis. Doctor Philosophy thesis. The University of Florida, 118p.
- Mukherjee, K.; Verma, Y.; Chakrabarti, S.; Singh, N and S. M. Paul Khurana. 2003. Cloning and Sequencing of Coat Protein Gene of an Indian Potato Leaf Roll Virus (PLRV) Isolate and its Similarity with other Members of *Luteoviridae*. *Virus Genes* 26(3) 247-253.
- Muskens, MW; Vissers, AP; Mol, JN; Kooter, JM. 2000. Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology* 43:243–260.
- Napoli, C.; Lemieux, C.; Jorgensen, R. 1990. Introduction of chimeric chalcone synthase gene into Petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2:279–289.
- Nigel, J.; Taylor and Claude, M. 2002. Microparticle Bombardment as a Tool in Plant Science and Agricultural Biotechnology. *DNA and Cell Biology* 21: 963-977.

- Nikan, J.; Barker, H. 2008. Conferring Resistance to PLRV in transgenic Tobacco plants through the induction of Post- transcriptional Gen Silencing. *Iran. J. Plant Path* 43(3):325-326.
- Ñopo, L.; Ghislain, M. 2004. Applied Biotechnology Laboratory Protocols: Agrobacterium-mediated Transgenic Plants. International Potato Center (CIP). Selection, Testing.
- Ochoa, C y Frey, F. 1999. Las papas de Sudamérica: Perú ,Volumen I. International Potato Center, 1036p.
- Overhoff, M., Alken , M., Far, R., Lemaitre, M., Lebleu, B., Sczakiel, G., Robbins, I. 2004. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *J Mol Biol* 34:871–881
- Palauqui, J.; Elmayan, T.; Pollien, J.;Vaucheret, H. 1997. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *The EMBO Journal* 16(15):4738–4745.
- Palucha, A.; Zagórski, W.; Chrzanowska, M and Hulanicka, D. 1998. An antisense coat protein gene confers immunity to potato leafroll virus in a genetically engineered potato. *European Journal of Plant Pathology* 104: 287–293.
- Pickford, A.; Cogoni, C. 2003. RNA-mediated gene silencing. *CMLS Cellular and Molecular. Life Science* 60: 871-882.
- Prins M. 2003. Broad virus resistance in transgenic plants. *Trends Biotechnol* 21:373–375.
- RIVRO (Instituto nacional de investigación de variedades de plantas cultivadas) 1989. Catálogo Holandés de variedades de patata. *Wageningen*, 83p.
- Sadowy E.; Maasen A.; Juszczuk M.; David C., Zago rski-Ostoja, W.; Gronenborn B. and Hulanicka M.D. 2001. The ORF0 product of Potato leafroll virus is indispensable for virus accumulation. *Journal of General Virology*, 82:1529-1532.



- Salas, E. 2007. Estudio de la variabilidad genética de la resistencia al virus del enrollamiento de las hojas de papa (PLRV) en una población de papas autotetraploides. Tesis para M.Sc, Mejoramiento Genético de Plantas. UNALM, Lima –Perú, 116 p.
- Salazar, L. 1995. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la papa, 226 p.
- Sambrook, J. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor. Laboratory Press. USA, 2.344 p.
- Samolski, K. 2004. Evaluación de la Resistencia al complejo viral del camote inducida por silenciamiento post-transcripcional de genes en plantas transgenicas de camote (*Ipomoea batatas* ( L ) Lam) transformadas via *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis para título de biólogo.UNALM, Lima- Perú, 159p.
- Sanders, P.; Sammons, B.; Kaniewski, W.; Haley, L.; Layton, J.; Lavallee, B.; Delannay, X and Tumer, N.1992. Field resistance of transgenic tomatoes expressing the tobacco mosaic virus or tomato mosaic virus coat protein genes. *Phytopathology* 82: 683-690.
- Sanford, J.; Johnston, S. 1985. The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J Theor Biol* 113:395- 405.
- Savenkov, E.; Valkonen, J. 2001. Coat protein gene-mediated resistance to Potato virus A in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *J Gen Virol* 2275-8.
- Scott, G.; Rosegrant, M.; Ringler, C. 2000. Raíces y tubérculos para el siglo 21. Tendencias, Proyecciones y Opciones de Política. Alimentación, Agricultura y Medio Ambiente. Documento de Discusión 31. IFPRI-CIP. Washington DC. 12 p.
- Scholthof, K.; Scholthof, H.; Jackson, A. 1993. Control of Plant Virus Diseases by Pathogen-Derived Resistance in Transgenic Plants. *Plant Physiol* 102(1):7-12.
- Smith, N.; Singh, S.; Wang, M.; Stoutjesdijk, P.; Green, A.; Waterhouse, P. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407(6802):319-333.

- Solomon, B.; Ruth, M.; Barker, H. 2001. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. *Heredity*. 86: 17-35.
- Solorzano, D. 2006. Transformación genética de *Solanum tuberosum* cv. Desiree para resistencia a PLRV y mecanismo de eliminación del marcador de selección. Tesis de grado. Universidad Nacional Federico Villareal, Lima-Perú, 110 p.
- Sonoda, S.; Nishiguchi, M. 2000. Delayed activation of post-transcriptional gene silencing and de novo transgene methylation in plants with the coat protein gene of sweet potato feathery mottle potyvirus. *Plant Sci* 156(2):137-144.
- Spooner, D.M. and W.L.A. Hetterscheid. 2005. Origins, evolution, and group classification of cultivated potatoes. *Darwin's Harvest: New Approaches to the Origins, Evolution, and Conservation of Crops* 285-307p.
- Srivastava, V.; Anderson, O. D. and Ow, D. W. 1999. Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci* 96: 11117-11121.
- Sudarshana, M.; Roy, G.; Falk, B. 2007. Methods for engineering resistance to plant viruses. *Methods Mol Biol* 354:183-95.
- Swiezynski, K. 1994. Inheritance of Resistance to Viruses.. *Potato Genetics* 552p.
- Tacke, E.; Priifer, D.; Schmitz, J and Rohde, W. 2001. The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *Journal of General Virology* 72: 2035-2038.
- Taliansky, M.; Mayo, M.; Barker, H. 2003 .Potato leafroll virus : a classic pathogen shows some new tricks. *Molecular Plant Pathology* 4(2): 81–89.
- Tang, W; Newton, R; Weidner, D. 2007. Genetic transformation and gene silencing mediated by multiple copies of a transgene in eastern white pine. *Journal of Experimental Botany* 58(3):545-554.

- Thomas, P.; Kaniewski, W and Lawson, E. 1997. Reduced Field Spread of Potato Leafroll Virus in Potatoes Transformed with the Potato Leafroll Virus Coat Protein Gene. *Plant Dis* 81:1447-1453.
- Thomas, P.; Lawson, E.; Zalewski, J.; Reed, G.; Kaniewski, W. 2000. Extreme field resistance in potato leafroll virus in potato cv. Russet Burbank mediated by the viral replicase gene. *Virus Research* 71 (1-2): 49-62.
- Tenllado, F.; Llave, C.; Díaz-Ruíz, J. 2004. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research* 102(1): 85-96.
- Tepfer, M. 2002. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annu Rev Phytopathol* 40:467-4691.
- The European Cultivated potato database. 2008.  
[http://www.europotato.org/display\\_description.php?variety\\_name=Desiree](http://www.europotato.org/display_description.php?variety_name=Desiree)
- Tougou, M.; Furutani, N.; Yamagishi, N.; Shizukawa, Y.; Takahata, Y.; Hidaka, S. 2006. Development of resistant transgenic soybeans with inverted repeat-coat protein genes of soybean dwarf virus. *Plant Cell Rep* 25:1213–1218.
- Tougou, M.; Yamagishi, N.; Furutani, N.; Shizukawa, Y.; Takahata, Y.; Hidaka, S. 2007. Soybean dwarf virus-resistant transgenic soybeans with the sense coat protein gene. *Plant Cell Rep* 26:1967–1975.
- Umar, Ummad-ud-Din M. Aslam Khan. 2011. Characterization of Environmental Conditions Conducive for the Development of Potato Leaf Roll Virus Disease. *Pak. J. Phytopathol* 23( 2), 92-97
- Vance, V and Vaucheret, H. 2001. RNA Silencing in Plants Defense and Counterdefense. *Science* 292(5525): 2277-2280.
- Vaucheret, H.; Beclin, C.; Fagard, M. 2001. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* 114: 3083-3091.

- Vazquez, R.; Asurmendi, S.; Hopp, H. 2001. Transgenic resistance in potato plants expressing potato leaf roll virus (PLRV) replicase gene sequences is RNA-mediated and suggests the involvement of post-transcriptional gene silencing. *Arch Virol* 146(7):1337-1353.
- Vector NTI Advance® 9 software. [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)
- Wang, M.; Abbott, D.; Waterhouse P. M. 2000. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Molecular Plant Pathology*. 1(6):347 – 356.
- Waterhouse, P.; Wang, M.; Lough, T. 2001. Review article Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411:834-842.
- Waterhouse, P.; Helliwell, C. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* 4(1):29-38.
- Wesley, S., Helliwell, C.; Smith, N; Wang, M.; Rouse, D.; Liu, Q.; Gooding, P.; Singh, S.; Abbott, D.; Stoutjesdijk, P.; Robinson, S.; Gleave, A.; Green, A.; Waterhouse, P. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* 27:581-590.
- Xu, L.; Song, Y.; Zhu, J.; Guo, X.; Zhu, Ch.; Wen, F. 2009. J. Conserved Sequences of Replicase Gene-Mediated Resistance to Potyvirus through RNA Silencing. *Plant Biol* 52:550–559.
- Zhao, Y.; Gu, W.; Cai, T.; Tagliani, L.; Hondred, D.; Bond, D.; Schroeder, S.; Rudert, M.; Pierce, D. 2001. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. *Mol. Breed* 8:323-333.

## VIII. ANEXO

### Anexo 1. Soluciones para Extracción de ADN

- **Tampón de extracción (CTAB 2x)**

Compuesto	Cantidad por 1 Litro
Tris-HCl	100.00 ml
EDTA	50.00 ml
NaCl	81.82 g
CTAB	20.00 g
PVP	10.00 g

Esterilizar por autoclave

- **Solución de Lavado I**

Compuesto	Cantidad por 100 ml
Acetato de sodio	1.64 g
Etanol absoluto	75.00 ml

- **Solución de Lavado II**

Compuesto	Cantidad por 100 ml
Acetato de amonio	0.077 g
Etanol absoluto	75.00 ml

## **Anexo 2. Protocolo de *Southern Blot***

### **A. Transferencia de ADN**

1. Retirar el gel del tampón de corrida, verificar en el transiluminador de luz UV que el ADN digerido se haya separado correctamente.
2. Lavar el gel 3 veces con 100 ml de agua destilada.
3. Colocar el gel en un recipiente con HCl 0.25M cantidad suficiente para cubrir el gel, y agitar suavemente por 10 min.
4. Enjuagar el gel brevemente con agua destilada.
5. Colocar el gel en 100 ml de solución de denaturación. Agitar suavemente por 15 min. Repetir este paso una vez más.
6. Colocar el gel en 100 ml de solución de neutralización. Agitar suavemente por 15 min. Repetir este paso una vez más.
7. Cortar la membrana de nylon del tamaño del gel y embeberla en agua destilada.
8. Cortar 2 pedazos de papel Whatmann 3MM del tamaño del gel.
9. Embeber la membrana y el papel Whatmann en el tampón SSC 20X pH 7.
10. Ensamblar el sistema de transferencia según se muestra en la Figura 9 y dejar durante toda la noche.
11. Al día siguiente desarmar el sistema, marcar la membrana con lápiz indicando la cara en donde está la muestra y lavar la membrana en tampón SSC 5X por unos segundos.
12. Dejar secar la membrana por unos min.
13. Fijar la membrana con luz UV y luego secarla durante 2 h a 80°C.
14. Para verificar que la transferencia de ADN fue completa se puede teñir el gel con bromuro de etidio y observar bajo luz UV.

## B. Soluciones usadas en la transferencia del ADN en *Southern Blot*

- **Acido clorhídrico 0.25 N**

Compuesto	Cantidad por 1 Litro
HCl	20.70 ml

- **Solución de denaturación**

Compuesto	Cantidad por 1 Litro
NaOH	20.00 g
NaCl	87.00 g

- **Solución de neutralización**

Compuesto	Cantidad por 1 Litro
Tris	121.14 g
NaCl	87.00 g

Esterilizar por autoclave.

- **SSC 20X**

Compuesto	Cantidad por 1 Litro
Sodio citrato, tribásico, dihidratado	88.23 g
NaCl	175.32 g

Esterilizar por autoclave

### C. Soluciones de lavado usadas en la hibridación con fósforo radioactivo

- **Solución I de Lavado**

Compuesto	Cantidad por 1 Litro
SSC 20X	100.00 ml
SDS 20%	5.00 ml

- **Solución II de Lavado**

Compuesto	Cantidad por 1 Litro
SSC 20X	50.00 ml
SDS 20%	5.0 ml

- **Solución III de Lavado**

Compuesto	Cantidad por 1 Litro
SSC 20X	5.00 ml
SDS 20%	5.00 ml

### Anexo 3. Soluciones para *Northern Blot*

- **Tampón de prehibridación/hibridación (*Northern Blot*)**

Compuesto	Cantidad por 100 ml
SSPE	5X
SDS	7%
Formamida deiónica	50%
Sol. Denhard	1X
DNA herring sperm*	1 mg/ml

\*Calentar a ebullición por 10 min y enfriar en hielo, agregar inmediatamente antes de usar.



- **SSPE 20X**

Compuesto	Cantidad por 1 ml
NaCl	175,3 g/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27,6 g/L
EDTA	7,4 g/L

Disolver en 800 ml de agua MQ, ajustar el pH a 7,4 y autoclavar.

- **Solución Denhard**

Compuesto	Cantidad por 1 ml
Ficoll 400	1%
PVP	1%
BSA	1%

Esterilizar por filtración, almacenar a -20°C.

- **Agua DEPC**

Compuesto	Cantidad por 1 Litro de agua MilliQ
DEPC	1.00 ml

Homogenizar toda la noche en frasco oscuro y esterilizar al día siguiente.

#### **Anexo 4. Soluciones de tinción, tampones, geles de agarosa y poliacrilamida**

- **TBE 10X**

Compuesto	Cantidad por 1 Litro
Tris base	180.00 g
EDTA 0.5 M, pH 8.0	40.00 ml
Ácido bórico	55.00 g

Disolver en agua destilada y esterilizar por autoclave.

- **SALB 10X**

Compuesto	Cantidad por 100 ml
Azul de Bromo fenol	0.15 g
Xilencianol	0.15 g
Naranja G	0.20 g
Sucrosa	60.00 g
TBE 10X	5.00 ml

- **Bromuro de etidio (10mg/ml)**

Compuesto	Cantidad por 100 ml
Bromuro de etidio	1.00 g

- **Tampón de carga 2X para ARN**

Compuesto	Cantidad por 1 ml
Formamida	0.60 ml
SALB 10X	0.20 ml
Agua DEPC 0.1%	0.20 ml

- **Tampón carbonato (2X)**

Compuesto	Cantidad por 100 ml
NaHCO <sub>3</sub>	80mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	120mM

Ajustar el pH a 10,2 y esterilizar por autoclave.

- **Gel de acrilamida**

Compuesto	Cantidad por 125 ml
Bis-poliacrilamida (24:1)	46.88 ml
TBE-10X *	12.5 ml
Agua DEPC	21.5 ml
Urea	52.5 gr

\* Solución tampón preparada con agua DEPC y autoclavar.

## **Anexo 5. Medios de cultivo bacteriano**

- **Medio LB (Luria-Broth)**

Compuesto	Cantidad por 1 Litro
Extracto de Levadura	5 g
Triptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Agar*	15 g

Ajustar a pH 7 y autoclavar. (\*) Solo para medio semi-sólido.

## **Anexo 6. Preparación de soluciones de propagación vegetal, stock de hormonas y antibióticos.**

- **Medio base MSA**

Compuesto	Cantidad por 1 Litro
Ácido Giberélico	0.020 g
Glicina-HCl	0.600 g
Ácido Nicotínico	0.150 g
Piridoxina	0.150 g
Tiamina-HCl	0.012 g

Ajustar a pH 5.6 y esterilizar por filtración

- **Acetosiringona (20000 mg/L)**

Disolver 200 mg en dimetil sulfóxido hasta alcanzar un volumen final de 10 ml. Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C.

- **Kanamicina (Km; 100 000 mg/L)**

Disolver 1g en 10 ml de agua destilada. Esterilizar por filtración. Almacenar a -20°C.

- **Rifampicina (Km; 100 000 mg/L)**

Disolver 1g en 10 ml de DMSO. Esterilizar por filtración. Almacenar a -20°C.

## **Anexo 7 Condiciones de PCR**

- **Componentes de Master mix de PCR**

<b>Componentes</b>	<b>Para 1 muestra</b>
Agua estéril libre de nucleasas	35.4 µl
Tampón de PCR 10x	5.0 µl
dNTPs (100mM)	0.4 µl
Iniciador sentido (5µM)	2.5 µl
Iniciador antisentido (5µM)	2.5 µl
Taq polimerasa (5U/µl)	0.2 µl
ADN (50-100 ng/µl)	1.0 µl
Volumen final	50.0 µl

- **Programa de PCR**

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
1. Desnaturalización inicial	94 °C	5 min
2. Desnaturalización	94 °C	1 min
3. Alineamiento	62.4 °C	45 seg
4. Extensión	72°C	1 min
Ir al paso 2 y repetir por 34 veces		
5. Extensión	72°C	7 min